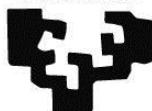


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

AHK KONPOSATUEN EFIKAZIA DUCHENNE MUSKULU-DISTROFIAREN ANIMALIA-EREDUETAN

Haizpea Lasa Fernandez

DOKTORE-TESIA

Neurozientziak Saila

Euskal Herriko Unibertsitatea

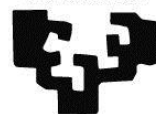
2019

Ikerlan hau Biodonostia Institutuko Neurozientziak saileko Gaixotasun Neuromuskularren taldean egin da Ainara Vallejo Illarramendi eta Adolfo José López de Munain Arreguiren gidaritzapean, Euskal Herriko Unibertsitateko Euskara Errektoreordetzako beka bati esker. Tesiko egonaldia Gema Ruiz Hurtadoren laborategian egin da Madrileko *12 de Octubre* ospitalean EHUko mugikortasunerako laguntza bati esker.

biodonostia

osasun ikerketa institutua
instituto de investigación sanitaria

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

AURKIBIDEA

LABURPENA

SARRERA

DUCHENNE MUSKULU-DISTROFIA..... 5

DMD gaixotasunaren aurkikuntza eta ikerketaren historia..... 6

Ezaugarri klinikoak 8

Diagnosia 10

Distrofina 13

Patologia..... 17

Tratamenduak..... 19

Ikerketa..... 21

RyR-KALSTABINA LOTURA DUCHENNE MUSKULU-DISTROFIAN 26

RyR kaltzio-kanalak eta kalstabina 26

nNOS eta oxidazio-estresa DMDn 33

DMDn ROS/RNSek RyR-en duen eragina 34

DMDn RyR-en aktibitatea modulatzeko tratamenduak..... 36

HIPOTESIA ETA HELBURUAK 39

1.KAPITULUA:

AHK konposatuen toxikotasuna eta eraginkortasuna sapje zebra-arrainetan

SARRERA..... 45

MATERIAL ETA METODOAK 47

AHK molekulen diseinua eta sintesia 47

Animaliak..... 47

Fenotipoa bereizteko birrefringentzia analisisa..... 47

Toxikotasuna 48

Genotipatzea..... 48

AHK konposatuen baheketa 50

Indar-neurketa	52
Estatistika	52
EMAITZAK	53
Toxikotasuna	53
<i>Sapje</i> zebra-arrainen genotipatzea	54
AHK konposatuen baheketa	57
Indar-neurketak.....	58
EZTABAIDA.....	61
2. KAPITULUA:	
AHK2 molekularen eraginkortasuna mdx saguen giharretako, bihotzeko eta nerbio-sistema zentraleko fenotipo distrofikoa	
SARRERA.....	67
MATERIAL ETA METODOAK	69
Animaliak eta tratamendua	69
AHK2aren toxikotasunaren azterketa	69
AHK2aren kontzentrazioa laginetan.....	70
AHK2aren biodistribuzioa	71
Funtzio muskularra aztertze probak.....	72
Funtzio kardiakoa aztertze esperimentuak	79
Funtzio kognitiboa aztertze probak.....	81
Estatistika eta berreskuratze-maila	82
EMAITZAK	84
Animalien pisua, ur-kontsumoa eta dosiak.....	84
AHK2aren toxikotasuna.....	85
Funtzio muskularra	85
Funtzio kognitiboa	103
EZTABAIDA.....	107
AHK2 tratamendua.....	108

Funtzio muskularra	109
Funtzio kardiakoa	112
Funtzio kognitiboa	113
Eztabaida orokorra	116
ONDORIOAK.....	119
BIBLIOGRAFIA.....	125
ESKERRAK.....	143

LABURPENA

Duchenne muskulu-distrofia (DMD) gaixotasun neuromuskular larria da eta X kromosoman dagoen distrofinaren geneko mutazio azpirakorrak dira erantzuleak. 3500 mutiletik bati eragiten dio batez beste eta, gaur egun, sendabiderik ez duen eta heriotza goiztiarra dakarren gaitza da. DMDn gihar-eskeletikoa eta bihotza kaltetuta daude, ahultasun eta endekapen progresiboa eta, azken fasean, bihotzeko gutxiegitasuna eraginez; horrez gain, gaixoen % 30ak nerbio-sistema zentrolean ere arazoak ditu.

Distrofina ez izateak zeluletako estres nitro-oxidatzailea areagotzen du eta hainbat proteinetan itzulpen ondorengo aldaketak eragiten ditu; besteak beste, RyR deituriko kaltzio-kanalak fosforilatu eta nitrosilatu egiten dira, eta honek RyR-en konformazioari eragiten die ezin baitzaie kalstabina proteina behar bezala lotu. Elkarrekintza honek RyR kaltzio-kanalak konformazio itxian mantentzen ditu, eta kalstabina batuta ez dagoenean irekita gelditzen dira kaltzio-jarioak eraginez.

Lan honen helburua kalstabina modulatzuz RyR kanalen funtzioa berrezartzeko diseinatu diren AHK molekulen eraginkortasuna aztertzea izan da Duchenne muskulu-distrofiaren animalia-eredu diren *sapje* zebra-arrainetan eta mdx saguetan.

Zebra-arrainetan AHK molekulek itu berarekin diseinatutako beste konposatu batzuk baino toxikotasun gutxiago dute, eta *sapje* arrainen fenotipo distrofikoa aldatzen ez duten arren, AHK1ek eta AHK2k indar aktiboa emendatzen dute. AHK2a giharrera, bihotzera eta garunera heltzen dela baieztatu da mdx saguetan. Animalia-eredu honetan AHK2aren 12 asteko tratamenduaren ondoren hobekuntza nabarmenak ikusi dira bihotzaren funtzionamenduan eta saguei egindako kognizio probetan. Funtzio muskularrari dagokionez, aurrez 5 asteko tratamendurekin maila funtzional eta histopatologikoan ikusitako hobekuntzak diluituago ageri dira 12 asteko tratamendu kronikoaren ondoren, honela AHK2ak mdx saguen giharretan duen eraginkortasuna gaixotasunaren eboluzioarekin gutxitzen dela ebatzi da.

SARRERA

DUCHENNE MUSKULU-DISTROFIA

Duchenne muskulu-distrofia (DMD) haurtzaroan gehien diagnostikatzen den distrofia muskular mota da. Muskulu-distrofiak herentziako gaixotasun talde zabal eta heterogeneoa osatzen dute, hots, jatorri genetikoa duten gaixotasunak dira. Duchenne muskulu-distrofia izeneko gaixotasuna batez beste 3500-5000 mutiletik batek pairatuko du eta muskulu-distrofien taldean sailkatutakoen artean larrienetako bat da, izan ere, mutikoen bizi-itxaropena murrizten du eta gaur egun ez du sendabiderik (Wells, 2018). DMDren ezaugarri nagusia haurtzaroan hastapena duen giharren ahultasun eta endekapen progresiboa den arren, arnasketa arazoek edo bihotzeko akatsek eragiten diete heriotza goiztiarra DMD duten gaixoei.

Distrofina izeneko proteina, *DYST*, da gaixotasun honen erantzulea. X kromosoman dagoen distrofinaren geneko, *DMD*, mutazio azpirakor ezberdinek bi fenotipoko gaixotasunak eragin ditzakete, Duchenne eta Becker distrofia, hurrenez hurren. Duchenne gaixotasuna dutenen kasuan, mutazioek RNAren irakurtaraua aldatzen dute, distrofinari bere funtzionalitatea galaraziz. Beckerren muskulu-distrofian, BMD, aldiz, mutazioek ez dute irakurtaraua aldatzen eta partzialki funtzionala den *DYST* proteinaren bertsio laburrago baten adierazpena ahalbidetzen dute; horregatik, kalte arinagoak eragiten ditu (Abbs, 1996). Distrofina X kromosomako gene bat denez, gizonezkoei bakarrik eragingo die, gene horren kopia bakarra dutelako. Emakumeen kasuan, genearen bi kopia dituztenez, bakarra funtzionala izanik, normalean ez dute gaixotasuna pairatuko, eta eramailearen rola beteko dute. X kromosomaren inaktibazioa duten emakume eramaileek sintomak izan ditzakete, baina hau ez da ohikoa (Kamdar & Garry, 2016). Dena den, kasu guztien % 30, gutxi gorabehera, mutazio espontaneo edo *de-novo* baten ondorio izan ohi dira, hau da, gaixotasun hau nozitzen duten gaixoen herenak ez du herentziaz jaso mutazio hau. Beraz, edozein familiatan gerta daiteke, eta, arraza edota kultura ezberdinetan prebalentzia bera duela uste da gaur egun.

Distrofina proteina funtzionalik ez izateak, giharren mekanismoan eragiten du, proteina honek funtzio estrukturala baitu, giharren arteko loturak egonkortuz. Gihar-zuntzak uzkurkorak dira, gorputzak egiten duen mugimendu bakoitzean laburtu eta luzatu egiten dira, alegia. Aktina filamentuak zelulaz kanpoko mintzarekin lotzeaz arduratzen da distrofina, indargetzaile lana egiten du uzkurduran eta gihar-zuntzen osotasuna mantentzea bermatzen du. Honela, proteina hau falta denean, giharra osatzen duten zelulak askoz ere errazago hondatzen dira (Ervasti, 2007).

Lehen sintomak haurtzaroan agertu ohi dira, bi eta sei urteren artean, hain zuzen. Gorputz-adarren eta enborrharen mugimenduetan nabaritu dira lehendabizi gaixotasun honen zantzuak, ibiltzerakoan zein eskaierak jaisterakoan batik bat. Zangosagarrak ere handituta izango dituzte mutiko hauek. Giharrak geroz eta ahulagoak izango dituzte, eta motor-funtzioak erasanda; hau guztia dela eta, nerabezaroaren hasieran, batez beste hamabi urteren bueltan, ezinbestekoa izango dute gurgildun aulkia erabiltzea. Giharrak pixkanaka atrofiatuz joango direnez, artikulazioetan kontrakturak eta eskoliosia pairatuko dituzte. Honela, sarritan ebakuntza kirurgikoak ezinbesteko bihurtzen dira nerabezaroaren amaieran. Gaixotasuna aurrera doan heinean, arnasketa kontrolatzen duten giharrak ere kaltetuz joango dira, eta gehienetan arnas-aparatuko huts batek edo bihotzeko akatsek eragingo dute gaixo hauen heriotza, tratamendurik gabe 20 urteren bueltan, baina kortikosteroideak zein sintomak arintzeko erabilitako beste hainbat zaintzek, bereziki gaueko bentilazioak, biziraupena luzatu die DMD duten gaixoei 30-40 urte bitarte (McGreevy, Hakim, McIntosh, & Duan, 2015). Gaur egun, sendabiderik ez duen gaitza da Duchenne muskulu-distrofia, eta erabiltzen diren tratamenduen helburua sintomak atzeratzea eta albo-kalteak gutxitzea da, baina oraindik orain, ez dago gaixotasuna erabat sendatu edota heriotza ekidingo duen terapiarik (Verma, Anziska, & Cracco, 2010).

DMD gaixotasunaren aurkikuntza eta ikerketaren historia

Gillaume Duchenne de Boulogne mediku frantsesak ibiltzeko gaitasuna galtzen ari zen 9 urteko mutiko baten kasu kliniko bat dokumentatu zuen 1858. urtean. Hamar urte geroago, ondoren bere izena hartu duen muskulu-distrofiari buruzko lan zehatz eta zabala argitaratu zuen, 13 pazienteren kasu klinikoak oinarritzat hartuta, eta honela ezagutarazi zuen gaixotasuna Duchenne doktoreak. XIX. mendean mikroskopioa erabiltzen hasi ziren, eta gaixo hauen gihar-biopsiak, hau da, gorputz barneko muskulu-ehunak, ikertu ondoren gihar-zuntzak atrofiatuta zituztela ikusi zuten. Gihar-zuntzen ordez gantz-zelulak zituztela ikusi zuten.

XX. mendearen hasieran muskulu-distrofia gehiago deskribatuz joan ziren. Dena den, Duchenne muskulu-distrofia zen sexuari lotutako patroia genetikoa betetzen zuen bakarra. 1950. urtean, Peter Emil Becker mediku alemaniarrek, sexu-kromosomarekin lotutako patroia genetiko bera betetzen zuen beste gaixotasun baten berri eman zuen, nolana ere, kasu honetan, gaixotasun muskular hau ez zen horren larria, eta biziraupen luzeagoa

zuten beratu sufritzen zutenek. Beranduago, Becker distrofia muskular gisa izendatu zuten (BMD).

60ko hamarkadan Duchenne gaixotasunaren oinarritzko akatsa izan zitekeenari buruz eztabaidatu zen, artean ez baitzekiten nerbio-sistema, giharrek edo zirkulazio-sistema ziren gaitz honen jatorria. 70eko hamarkadaren bueltan, diagnostikorako aurkikuntza esanguratsua egin zen, odol-analisi batean seruma aztertuta, DMD gaixotasuna zutenek kreatina-kinasa (CK) izeneko entzima baten kontzentrazio altuagoa zutela ikusi baitzuten. Bestalde, prednisone izeneko kortikosteroideak onurak izan zitzaizkela ikusi zuten tratamendu gisa. Esteroide honen erabilerak giharren degenerazio-prozesua mantsotzen du.

1987. urtean topatu zuten DMD eta BMD gaixotasunen erantzulea zen genea (Eric P. Hoffman, Brown, & Kunkel, 1987). Genetika molekularreko teknikan aurrerapen handiak egin ziren, eta honela lortu zuten X kromosoman zegoen gene akastuna identifikatzea. Urtebete beranduago, gene horrek kodifikatzen zuen proteina antzeman zuten, hots, distrofina. Proteina hau giharretako zelulen mintzean dago, eta mintzaren propietate fisikoak mantentzen ditu. Beraz, ikerketa alor honetara bideratu zen, hipotesi nagusizat gihar-zuntzen mintzeko kaltea hartuta.

Behin gene eta proteina erantzulea aurkituta, ikerketak aurrerapauso garrantzitsuak egin zituen hurrengo urteetan. Distrofina proteinak ez duela bere kasa funtzionatzen ikusi zuten, baizik eta, beste proteina batzuekin elkartuz, distrofina-glikoproteina izeneko konplexua eratuz. Gainera, distrofinaren genearen mutazio ezberdinek lotura zuzena dutela ikusi zuten gaixotasunaren larritasunarekin. Mutazioaren arabera proteina erdi funtzionala edo ez funtzionala kodifikatuko da. Becker muskulu-distrofiaren kasuan erdi funtzionala da proteina, eta horregatik ez da horren larria, Duchennekin alderatuta; kasu honetan, proteina ez da funtzionala, eta zelulak berehala suntsituko du, eta, beraz, gaixoek ez dute distrofinarik izango.

Azken 20 urteetan distrofinari buruzko ikerketa asko hedatu da, eta bere funtzioa gihar-zuntzetako mintza babestea dela uste den arren, ez da erabat argitu bere mekanismoa. Gainera, terapia berritzaile ugari proposatu dira, eta saguekin zein beste zenbait animalia-eredurekin eginiko hainbat probetan emaitza oso interesgarriak ikusi diren arren, oraindik ez da sendabiderik ezagutzen.

Ezaugarri klinikoak

Duchenne muskulu-distrofiaren ezaugarri ezagunenak giharretako kaltearekin dute zerikusia, izenak dioen bezala. Dena den, distrofina ez izateak ez du giharretan bakarrik eragiten, eta, multzo ezberdinetan sailkatuta, hauek dira sintomarik ohikoenak:

Giharretako arazoak

DMD duten haur jaioberriak asintomatiko bezala deskribatu dira orain arte, nahiz eta azkenaldian fase subklinikoko hainbat zantzu patologiko dituztela baieztatu den. Aurrenekoz manifestazio klinikoak lehenengo urtearen amaieran azaleratu daitezkeen arren, ageriagoko sintomak 2-5 urteko adinarekin izan ohi dituzte. Egun, gizartean gaixotasunekiko kontzientzia handiagoa bada ere, lehen sintomak agertzen direnetik diagnostikora batez beste 2,5 urteko atzerapena dago (Ciafaloni et al., 2009). Gaixotasun hau duten umeak berantiarrak dira oinez ikasterako garaian eta ikasten dutenean, zangosagarreko giharrak handitzen zaizkie. Eskolaurrean ume hauek baldar samarrak dirudite, maiz erortzen baitira. Eta, denbora gutxira, eskaillerak igotzeko, lurretik altxatzeko zein korrika egiteko zailtasunak izango dituzte, ahultasun muskularra handitzen doan neurrian. Mugikortasun-arazo hauek izan ohi dira gurasoen arreta pizten dutenak, eta kasu gehienetan eskolaurre-garaian diagnostikatzen zaie Duchenne muskulu-distrofia, batez beste 5 urterekin.

Honela, urteak aurrera doazen heinean, geroz eta gehiago kostatzen zaie oinez ibiltzea eta ibilera arraroa izaten dute, hanka puntetan ibiltzen dira, oreka mantendu ahal izateko sabela kanporantz eta sorbaldak atzerantz dituztela. Hasierako urteetan sintomak *plateau* egoeran bezala mantentzen badira ere, 6-8 urterekin okerrera egiten du gaixotasunak eta 12 urterekin ia denek gurpildun aulkia behar dute. Aurrerago, gaixotasunaren fase berantiarrean laguntza mekanikoa ezinbestekoa izango dute gorputz-adarrak mugitu ahal izateko eta, gainera, giharretako zurruntasuna eta kontrakturak ohikoak bilakatuko dira (Verma et al., 2010).

Hezurduran arazoak

Giharrak behar den bezala ez daudenez, ez dira gai izango hezurdurari eusteko. Bizkarrezurra okertuko zaie, eta eskoliosia eta lordosia izan dezakete. Sarritan, eskoliosia dela eta, ebakuntza kirurgikoa beharko dute (Verma et al., 2010).

Nerbio-sistema zentraleko arazoak

DMD duten mutikoen herenak, gutxi gorabehera, hainbat kognizio eta jarrera-arazo izaten dituzte. Gaixoen % 30ak adimen-atzeratasuna dute (inteligentzia koizientea < 70) eta % 40k irakurketa-arazoak dituzte, dislexia diagnostikatutako haurren antzekoak. Gainera, hainbat jokaera-arazo intzidentzia altuagoan agertzen dira, besteak beste: % 32k atentzio-defizita eta hiperaktibitatea (ADHD) dute, % 27k antsietatea aurkezten dute, % 15ek autismo-espektroko sintomak (ASD) dituzte, % 6,3k epilepsia dute eta % 4,8k trastorno obsesibo-kompulsiboa (OCD) dute (Doorenweerd, Mahfouz, et al., 2017). Honela, adimen-atzeratasunak, jokaeran arazoak edo komunikatzeko zailtasunak are gehiago zaildu dezake gazte hauen bizimodua.

Gihar-patologiak duen bilakaera zehatzago aztertu bada ere, kognizio-patologiari buruz ez da horrenbeste ikertu, ez dira ikerketa luzeak edo longitudinalak egin nerbio-sistema zentraleko kalteak progresiboak diren edo ez jakiteko. Dena dela, DMD duten haurren garunak gaixo helduen garunekin konparatzean, helduetan atrofia areagotuta dagoela atzeman zuten (Yoshioka, Okuno, Honda, & Nakano, 1980).

Arnas-aparatuko disfuntzioak

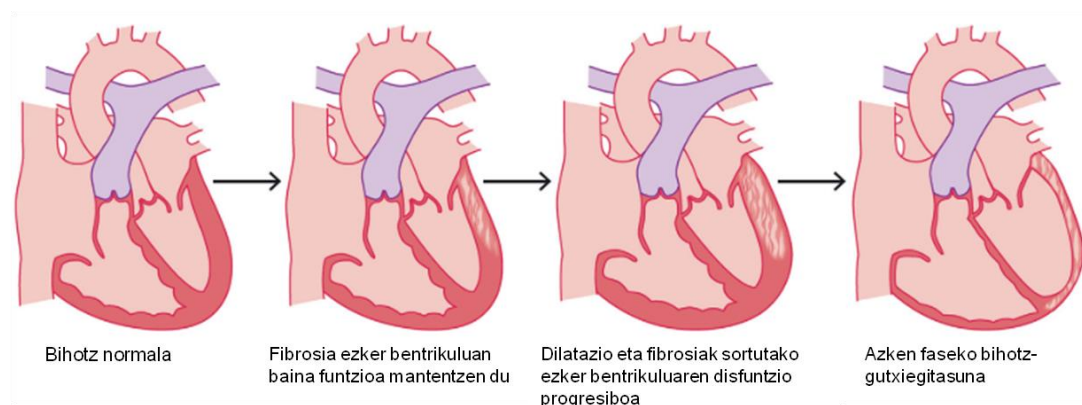
Urteek aurrera egin ahala diafragma giharra geroz eta ahulagoa izango dute, eta 25 urteren bueltan arnasa hartzeko zailtasun handiak izan ohi dituzte. Biriken funtzioa murriztuta dago, arnasketa-giharren ahultasunagatik eta bularreko deformazioagatik (kifoeskoliosia), arnasketa-aparatuko infekzioekin batera. Honek guztiak arnas-aparatuko gutxiegitasuna izateko aukera emendatzen du (Verma et al., 2010), eta, kasu askotan, arnas-aparatuko akatsa izaten da Duchenne muskulu-distrofia pairatzen dutenen heriotzaren kausa.

Bihotzeko arazoak

Distrofina ez izateak kardiomiopatia eragin dezake, hots, miokardioaren disfuntzioan datzan bihotz-gaixotasuna. Aipatzekoa da Becker muskulu-distrofia gaixotasunean, giharretako sintomak arinagoak diren arren, gaixoen % 70ak kardiomiopatia jasaten duela, sarri DMD gaixoetan baino larriagoa gainera, heriotzaren kausa nagusia izanez (Kamdar & Garry, 2016).

DMD duten gaixoetan 10 urte bitarte ez dira bihotz-gutxiegitasunaren zantzuak atzematen, paziente batzuk elektrokardiograman anomaliak izan ditzaketen arren (D'Amario et al., 2017). 10-18 urte artean gaixo batzuk aurreneko sintomak azaleratzen

dituzte, ezker bentrikuluak dilatatzuz eta fibrosia agertuz doan heinean (1. IRUDIA), baina, 18-20 urtetik aurrera DMD duten gaixoen % 95ek bihotzeko arazoak izaten dituzte, hala nola: elektrokardiografia (EKG) anormala, kaltetutako hemodinamika, hau da, odol-fluxuaren dinamika okerra, bihotz-barrutiaren dilatazioa eta ezker bentrikulu-bonbaren akatsak (Bostick, Shin, Yue, & Duan, 2011). Kardiomiopatiak gain, arritmia ere izaten dute (Gao & McNally, 2015). Honek guztiak gutxiegitasun kardiako bat izateko arriskua areagotzen du eta heriotza eragin diezaieke (Verma et al., 2010).



1.IRUDIA. Kardiomiopatiaren progresioa DMDn. Egokitutako irudia (Kamdar & Garry, 2016).

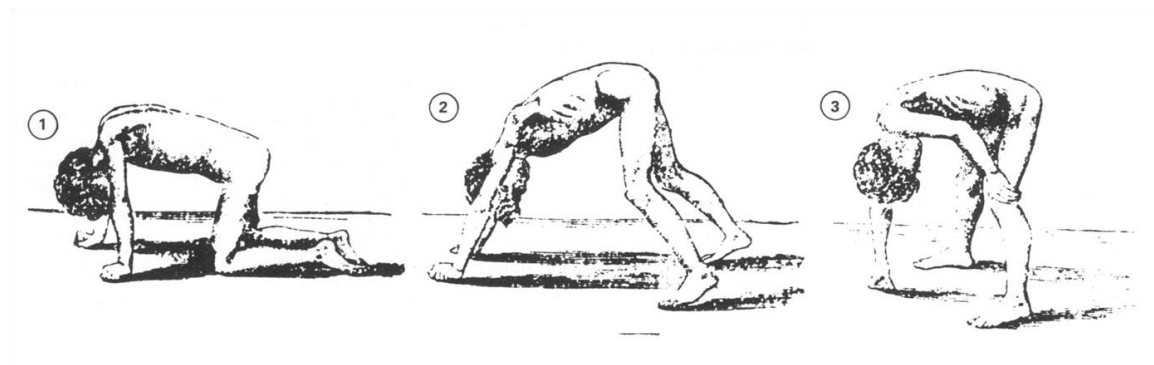
Bizi-itxaropena

Historikoki Duchenne muskulu-distrofia izan duten gaixoek bizitzako bigarren hamarkadan zehar hil izan dira, gehienetan arnas-aparatuko arazoek eraginda. Dena den, gaueko bentilazio lagunduak, bizkarrezurra egonkortzeko kirurgiak eta kortikosteroideen tratamenduak DMD duten pazienteen bizi-itxaropena igo du 30 urte ingurura, eta badira 40 urtera iritsi direnik ere (Kamdar & Garry, 2016). Egun, kardiomiopatia da heriotzaren kausa nagusia, DMD zein BMD gaixotasunetan.

Diagnosisia

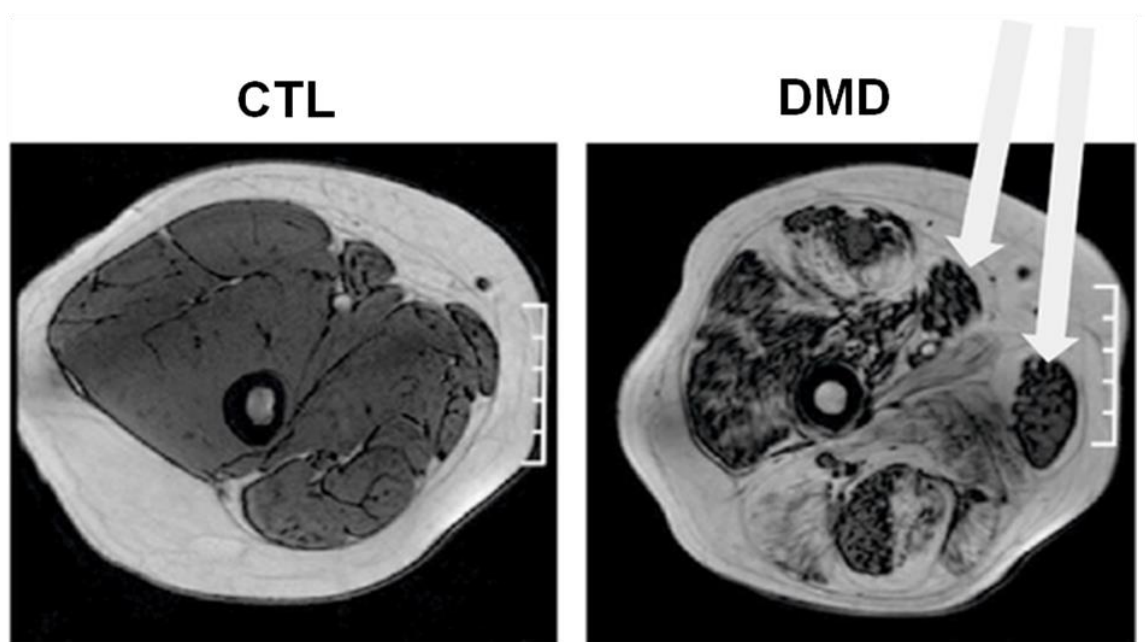
Gurasoak izan ohi dira lehen sintomak antzematen dituztenak. Nolanahi ere, ezinbestekoa da medikuarenera joatea Duchenne muskulu-distrofia diagnostikatu ahal izateko. Lehenik eta behin azterketa fisikoa egiten zaie. Ume hauek ibilera arraroa duten (hankak ahateen antzera mugitzea, oin-puntetan ibiltzea eta postura lordotikoa izatea), zangosagarretako hipertrofia duten, altxatzeko Gower maniobra egiten duten (lurretik altxatzeko ezohiko mugimenduak egitean datza, hankak zabaldu eta eskuak lurrean jarriz zutitzen dira, eskuak baliatuz altxatzen dira alegia, 2. irudian ikusi daitekeen bezala) eta

eskailerak igotzean zailtasunak dituzten edo ez egiaztatzen dute medikuek, gainerako probekin hasi aurretik (Verma et al., 2010).



2. IRUDIA. Lurretik altxatzeko Gower maniobra.

Paziente susmagarriei odolean duten CK maila neurtzen zaie. CK edo kreatina-kinasa izeneko entzima giharreko zelulen barruan egoten da, baina lesio muskular bat dagoenean, odolera ateratzen da. Honela, ohikoa den CK maila baino 25-750 aldiz altuagoa izango dute Duchenne gaixotasuna duten haurrek, batez beste 5000-150.000 U/l, CK maila normalak 200 U/l edo baxuagoak direlarik (Verma et al., 2010). Hala ere, CK altua dela eta, ezin da zuzenean gaixotasun hau diagnostikatu, beste patologia batzuk ere izan daitezke eta CK altua izatearen errudun. Gainera, erresonantzia magnetiko bidezko irudiak (MRI) aztertuz giharren degenerazio-maila neurtu daiteke (3. IRUDIA). Era berean, proba hau gaixotasunaren progresioa aztertzeko erabiltzen da, gihar-zuntzen tokia pixkanaka ehun fibrotiko edo gantzatsuak nola hartzen duen ikusi daiteke (Bonati et al., 2015).



3. IRUDIA. 12 urteko mutiko osasuntsu baten eta Duchenne muskulu distrofia duen gaixo baten izterreko zeharkako sekzioen irudiak MRI bidez. Geziekin adierazi diren giharrak estres mekaniko gutxien jasaten dutenak dira, eta, gainerakoekin alderatuz, egitura ondo mantentzen dute.

Proba genetikoak egitea izango da hurrengo pausua. Jakina den bezala, gaixotasunaren kausa distrofinaren genearen mutazioak dira; mutazio hauek, ordea, oso ezberdinak dira euren artean. Horregatik, material genetikoa odoletik edo giharreko lagin batetik lortu ostean, hainbat proba egin beharko dira mutazioak identifikatzeko. Kasu gehienetan, gaixoen % 60-65ak hain zuzen, exoi baten edo gehiagoren delezioa du. Delezioa DNA zati bat galtzea eragiten duen mutazioa da, material genetikoa galtzea dakar; eta, ondoren proteina sortzeko informazioa faltakoenez, gaixotasun genetiko larriak eragin ditzake, horren adibide dugu Duchenne muskulu-distrofia. Beste batzuetan, % 5-10ek batez beste, material genetikoaren bikoizketak izango dituzte. Delezioa eta bikoizketa identifikatzeko proba genetikoak egiten dira lehendabizi, multiplex PCRa, MLPA edo CGH mikroarraiak eginez (Flanigan et al., 2009). Eta emaitza negatiboa bada, gene osoa sekuentziatuko da ondoren.

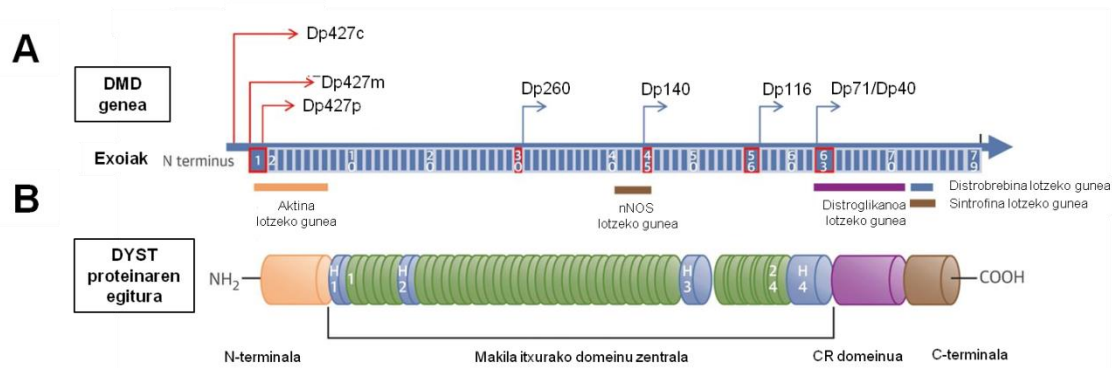
Gaur egun, baliabide klinikoak izanik, behintzat, edozein mutazio identifikatzeko aukera dago. Hala ez balitz, giharreko lagin bat hartu beharko litzateke; metodo hau, ordea, askoz ere inbaditzaileagoa da, kirurgia bat egin beharko litzatekeelako. Muskulu biopsian distrofinaren adierazpena aztertu beharko litzateke RNA edo proteina mailan. Histologia aztertzean DYST proteina ez da atzematen edo oso maila murriztuan detektatzen da, eta

gainera giharren nekrosia, fibrosia, gantz-ehunen ordezkapena eta gihar-zuntzen tamainan bariazioak ikusi daitezke (Suriyonplengsaeng et al., 2017).

Distrofina

DMD genea eta mutazioak

X kromosomaren beso motzean (Xp21) kokatutako distrofinaren genean, *DMD*, dauden mutazioak dira gaixotasunaren erantzuleak. *DMD* genea gizakien artean handiena da, >2,2 Mb (Gao & McNally, 2015), eta *frameshift* edo irakurtaraua aldatzen duten hainbat mutazio azpirakorrek distrofina-proteinaren, *DYST*, adierazpena eragozten dute. 79 exon ditu (4. IRUDIA, A) eta 14 kb inguruko cDNA kodifikatzen du (Shimizu-Motohashi et al., 2019). Exonak genearen edo DNAREN zati kodifikatzaileak dira eta sintetizatu beharreko proteinen kate polipeptidikoa osatuko duten aminoazidoak eta sekuentzia kodifikatzailearen hasiera eta amaiera zehazten dituzten kodonak ditu. RNA helduaren iturri bakarrak dira, eta haien artean intron izeneko zati ez-kodifikatzaileak tartekatzen dira.



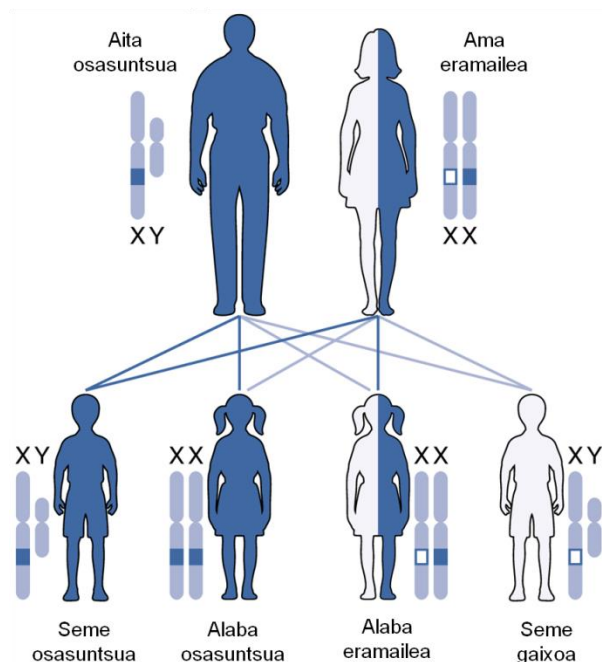
4. IRUDIA. Distrofina genea eta proteina. **(A)** *DMD* genearen 79 exonak, gorri markatutakoak *splicing* alternatibo bidez lortu daitezkeen isoforma ezberdinen hasierak dira. Luzera osoko 3 isoformek, Dp427c, Dp427m eta Dp427p, promotore ezberdinak dituzte (c, neuronal; m, giharrekoa; eta p, Purkinje zeluleta). Luzera laburragoa duten isoformak ondorengoak dira: Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 eta Dp40. **(B)** *DYST* proteinaren egitura. N-terminalean aktinara lotzeko gunea eta C-terminalean distrofina-glikoproteina konplexura lotzeko guneak adierazi dira, erdian espektrina itxurako proteinek osatzen duten makila domeinua dutelarik. Egokitutako irudia (Kamdar & Garry, 2016).

Esan bezala, distrofinaren genea X kromosoman kokatzen da, sexu-kromosoman alegia. Honela, neskek genearen bi kopia izango dituzte, eta, mutilek, aldiz, kopia bakarra.

Duchenne muskulu-distrofia gaixotasun genetiko bat da, X kromosomari lotutako herentzia azpirakorra betetzen duena, hain zuzen. Herentzia azpirakorra izateak gaixotasuna pairatzeko gene horren bi kopia akastun behar direla esan nahi du. Kasu honetan, ordea, azpirakorra izateaz gain X kromosomari lotuta dago. Mutilek kopia bakarra dutenez, nahikoa izango da X kromosoman gene akastuna izatea DMD gaixotasuna izateko. Neskek, berriz, kopia akastun batekin normalki ez dute DMD gaixotasuna izango, beste kopia funtzionala edukita nahikoa izango baita distrofina proteina sintetizatzen (5. IRUDIA).

Orain arte, *out of frame* edo irakurtaraua aldatzen duten 7000 mutazio baino gehiago identifikatu dira DMDren erantzule bezala, gehienak delezio luzeak (kasu guztien % 60-65) eta bikoizketa luzeak (kasuen % 5-10) dira, eta, gainerakoak delezio eta bikoizketa laburrak, *splicing*-ean eragiten duten mutazioak edo nukleotido bakarreko mutazioak dira. Ohikoenak diren *hotspot*-ak 45-55 bitarteko exonak dira (Gao & McNally, 2015). Irakurtaraua aldatzen duten mutazio hauen ondorioz DYST proteina ez da behar bezala sintetizatzen eta berehala degradatzen da. Aipatzekoa da *DMD* genean dauden beste *in-frame* edo irakurtaraua aldatzen ez duten zenbait mutaziok partzialki funtzionala den distrofinaren adierazpena ahalbidetzen dutela, pertsona hauek kalte arinagoak izaten dituzte eta Becker distrofia-muskular, BMD, bezala ezagutzen da (Hoogerwaard et al., 1999).

Gene honetako mutazioek bi jatorri izan ditzakete. Batetik, herentziaz jasotakoa izan daiteke. Kasu honetan, beti ama izango da gene akastunaren eramailea, Duchenne muskulu-distrofia duten mutilak ez baitira aita izateko gai izaten, orain arte behintzat, eta izango balira ere alaba eramaileak izango lituzkete. Nesken kasuan, gene akastuna izan arren orokorrean sintomak ez daudenez, familian beste kasurik izan ezean, haur gaixoa izan arte amak ez du jakiten distrofinaren gene akastun baten eramailea denik. Eramaile eme gehienak asintomatikoak izan arren, % 20 inguruk giharretako ahultasuna edo kardiomiopatia arinak garatu ditzakete (Hoogerwaard et al., 1999). Ama eramailea izanik jaiotzen diren haur arren % 50ak DMD izateko probabilitatea du, eta emeen % 50 eramailea izango da (5. IRUDIA). Horregatik, familian DMD kasuren bat izanez gero edo dagoeneko DMD duen haur baten guraso izanda, haurdun geratu aurretik diagnostiko genetikoa egin behar da. Eramailea izanez gero, gaur egun badaude nahikoa baliabide lagundutako ugalketa bidez gene akastun hau ekiditeko.



5. IRUDIA. X kromosomari lotutako herentzia azpirakorra.

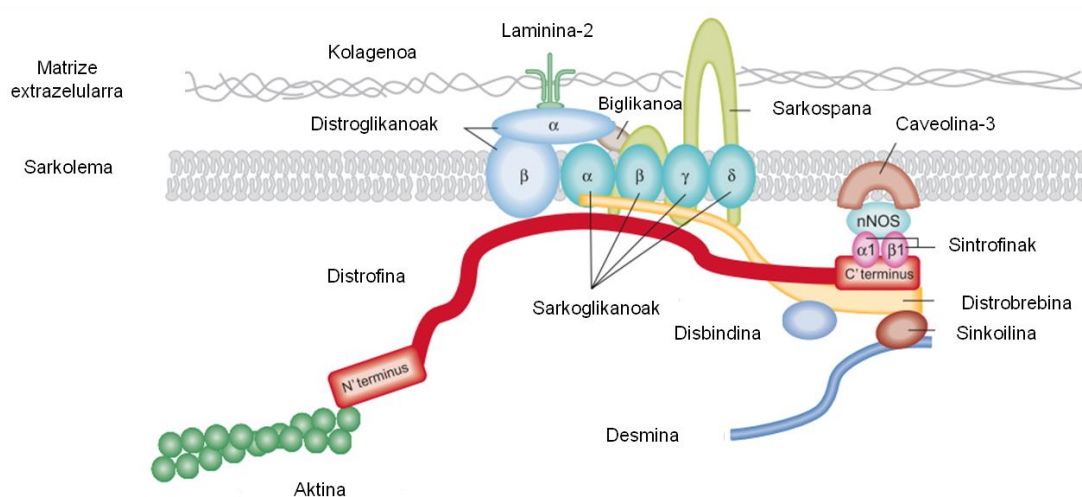
Bestetik, mutazio espontaneoak edo *de-novo* izenekoak izan daitezke gaixotasun honen eragileak (% 30). Kasu esporadiko hauetan, amak familia-historia negatiboa du eta bere genomaz ez da mutaziorik aurkitu, beraz mutazioak lerro germinalean sortu dira. Dena den, lerro germinalean mosaizismoaren teoria ezin da baztertu, izan ere, familia hauetan % 7-10eko arriskua dago mutazioak errepikatzeko. Behin DMD duen haur bat izan eta gero lerro germinaleko mutazio espontaneoaren ondorioz, aholkularitza genetiko eta diagnosi prenatala egitea gomendatzen dute, herentziazko kasuetan bezala (Abbs, 1996).

***DYST* proteina eta funtzioa**

Distrofina 427 kDa-eko makila itxurako proteina handia da eta distrofina-glikoproteina konplexuaren parte da (DGC). *DYST* proteinaren funtzioa estrukturala da ezagunena, giharren mintz extrazelularra uzkurdu-makinariarekin lotuz giharren uzkurduaren indargetzaile gisa jokatzen du; baina estrukturalaz gain beste funtzio batzuk ere badituela uste da. Muskulu eskeletikoan soilik ez, baina muskulu kardiakoan, muskulu lisoan eta nerbio-sistema zentrolean ere kokatzen da *DYST* proteina (E. P. Hoffman & Schwartz, 1991).

Distrofinak 4 domeinu funtzional ditu: N-terminala (NT), makila itxurako domeinu zentrala, zisteinaz aberatsa den domeinua (CR) eta C-terminala (CT) (4. IRUDIA, B). Mintzeko hainbat proteina (detroglukanoa, sarkoglikanoa, sarkoespana) eta zitosoleko

beste zenbait proteinarekin (sintrofina, distrobrebina, neuronetako oxido nitrikoaren sintasa, hots, nNOS) batera arestian aipatutako distrofina-glikoproteina konplexua osatzen dute 6. irudian ikusi daitekeen moduan (Ervasti, 2007). Domeinu zentrala 24 espektrina moduko errepikapenez osatuta dago. Domeinu bakoitza helize hirukoitzez kiribilduta dago, eta N-terminala aktinara lotuta dagoen bitartean, C-terminala mintzean dauden eta DGC-ko parte diren beste proteina batzuei lotuta dago. Ezaugarri hauek kontuan izanik giharren uzkurdua-prozesuan, shocken absortzioaz eta indarraren transdukzioaz arduraz litekeela uste da (Allen, Whitehead, Allen, Whitehead, & Froehner, 2015). Berriki egindako ikerketek argi uzten dute DYST proteinak eta DGC-ko gainerako proteinek funtzio estrukturala izateaz gain seinalizazioan parte hartzen dutela, eta ezinbestekoak direla giharren funtzionamenduan (Allen et al., 2015).



6. IRUDIA. Distrofina-glikoproteina konplexua (DGC) (Nowak & Davies, 2004).

Gihar mota ezberdinetan DYST proteinak duen egitura eta funtzioari buruz hitz egin da orain arte, baina distrofina proteinak isoforma ezberdinak ditu, *DMD* geneak hainbat promotore baititu *splicing* alternatiboak ahalbidetuz (4. IRUDIA, A). Luzera osoko isoforma nagusiki giharretan (Dp427m) eta neurona kortikaletan (Dp427c) adierazten da, eta, Dp427p isoforma luzea Purkinje zeluletan dago. Luzera osoko distrofinaz gain, laburragoak diren 5 isoforma ezagutzen dira, pisu molekularren arabera izendatzen direnak hain zuzen: Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 eta Dp40. Dp260 erretinan adierazten da gehien bat, Dp140 nerbio-sistema zentrolean, erretinan eta giltzurrunean, Dp166 isoforma bizkarrezurreko Schwann zeluletan eta Dp71 zein Dp40 garuneko ehunetan (Kogelman et al., 2018). Isoforma hauen guztien funtzioa ez da asko ezagutzen, orain arteko ikerketa gehienak isoforma hauek zein ehunetan adierazten diren aztertzeraz bideratu dira eta (Doorenweerd, Mahfouz, et al., 2017).

Patologia

Gihar-biopsien ezaugarri bereizgarriena nekrosia da, degeneratzen ari diren gihar-zuntzak alegia. Sarritan klusterretan metatuta daude endekapen-prozesuan dauden zuntz hauek, eta histopatologia aztertzean makrofagoz eta linfozitoz inguratuta daudela ikusi daiteke. Gainera, heldugabeko hainbat zuntz txiki ikusi daitezke nukleoa erdialdean dutela. Gihar-zuntz helduetan nukleoa periferian kokatzen dira, eta, beraz, nukleo zentralak birsortze-prozesu baten adierazle dira, aurrez degeneratu diren zelulak erregeneratu edo birsortzen ari direnaren erakusle, hain zuzen. Gaixotasunaren hasierako faseetan oreka mantentzen da nekrosi eta birsortze-prozesuen artean, baina, denborak aurrera egin ahala, birsortze-gaitasuna agortzen joaten dela dirudi eta pixkanaka ehun konektibo zein gantzatsuak hartuko du gihar-zuntzen tokia (Deconinck & Dan, 2007). Antzeko prozesua ematen da gihar eskeletiko zein kardiakoan, bihotzeko kardiomiotoak ere nekrosia jasaten dute, eta hildako bihotz-zelulen tokia ehun fibrotikoak ordezkatzeko 1. irudian ikusi daitezkeen moduan (Bostick et al., 2011). Honela, gihar-zuntzen nekrosia eta mioblastoen birsortzean dagoen desorekak eragindako nekrosia da DMD gaixotasunaren ezaugarri patologiko nagusia.

Prozesu nekrotikoa nola eta zergatik ematen den azaltzeko hainbat teoria daude, baina oraindik ez da zehatz-mehatz ezagutzen distrofina eza eta nekrosiaren arteko erlazio zuzena. Distrofina galtzeak hainbat bide patologikotan eragina du, besteak beste, hantura-erantzunean, kaltzioaren homeostasiaren galeran, iskemian eta giharren birsortzean (Verhaart & Aartsma-Rus, 2019). Hala ere, DMD gaixotasunaren patofisiologia-bide nagusiak bi direla uste da: mekanikoa eta kaltzio-homeostasi galera (Deconinck & Dan, 2007). Azken autore hauek distrofina ezak hanturan, apoptosian, birsortzean eta fibrosian ere eragin zuzena duela diote. Mugimendu mekanikoak, hau da, giharren erabilerak berak, kalteak eragiten ditu distrofinarik gabeko zuntzetan. Uzkuertze-eszentrikoak, giharren luzera handitzen duen mugimendua, estres handia eragiten die kaltetutako gihar-mintzei eta mikro-lesioak eragiten ditu, pixkanaka larrituz joango direnak, mintzaren hauskortasuna areagotuz. Aipatzekoa da, DMD duten gaixoentzat mesedegarria dela terapia fisikoa egitea giharren funtzioa egonkortzeko, baina, modu berean, gehiegizko ariketak, eta batez ere, ariketa eszentrikoak, hau da, giharra luzatzea behartzen dutenak, kaltegarriak dira paziente hauentzat (Hu & Blemker, 2015). Zeluletako mintza kaltetuta izatea arazo larria da, sustantziei mintzean barna jariatzen

uzten baitie; batzuek zelula barnetik zirkulazio-sistemara egiten dute ihes, eta beste batzuek, aldiz, alderantziz, odoletik zelula barnera igarotzen dira. Prozesu horrek kalte egiten dio giharrari, bereziki kaltzio ioiak (Ca^{2+}) sartzen direnean, kaltzio-fluxu honek hainbat proteasa, horien artean kalpainak, eta hantura-zitokina aktibatzen ditu, giharren degenerazio progresiboa eraginez (Allen et al., 2015). Zelula barnetik odol-zirkulaziora ihes egiten duten sustantzien artean, garrantzitsuena CK entzima da, kreatina-kinasa, zeinak energia sortzeko prozesuan parte hartzen duen, giharrak ondo funtziona dezan behar duen energia sortzen, hain zuzen. Gihar-zuntzetan CK kopurua jaistean, giharrak funtzionatzeko gaitasuna galtzen du, eta, ondorioz, giharrak ahuldu egiten dira. Zelulek CK askatzeak odolean duen balore arrunta, 0tik 200era bitartekoa, 25-750 aldiz igoarazten du. Odolean CK gehiegizko kopuru horrek ez du albo-ondoriorik, baina giharra kaltetuta dagoela adierazten du.

Dena den, badirudi kaltzio deshomeostasia ez dela soilik mintzeko kalteen ondorioz gertatzen, baizik eta distrofina parte den DGC konplexuaren gabeziak seinalizazioan eragindako hutsek ere garrantzizko rola dutela uste da. Oraindik nekrosi-prozesuan sartu gabeko DMD duten gaixoen giharretan kaltzio kontzentrazioak altuagoak direla deskribatu zuten (Burr & Molquentin, 2015), eta honek adierazten du kaltzioaren desregulazioa hastapenetako mekanismo patologiko bat izan daitekeela. Gertaera hau azaltzeko hainbat proteina inplikaturik egon daitezkeela uste da. TRPC kanala, *transient receptor potential canonical channel*, mekanikoki aktibatzen den kaltzio-kanala da eta ikerketarako erabiltzen den mdx sagu ereduan adierazpena emendatuta dagoela deskribatu dute (Millay et al., 2009). Kaltzioarekin lotutako beste hainbat proteinen adierazpena ere igota dagoela ikusi dute gihar distrofikoetan (Burr & Molquentin, 2015; Farini et al., 2018), besteak beste, Orai1, STIM1 eta IP3R. Kaltzioaren askapenarekin lotutako proteina hauez gain, kaltzioa erretikulu sarkoplasmikora (SR, gihar-zeluletako erretikulu endoplasmikoaren izena) sartzen duen SERCA proteinaren adierazpena jaitsita dagoela ere deskribatu dute (Mázala et al., 2015). Hala ere, distrofinak eta DGC-ak proteina hauen guztien adierazpena modulatzeko erabiltzen duten mekanismoa ez da ezagutzen.

DYST falta denean nNOS entzima ez da DGC konplexuaren parte eta honen ondorioz estres nitro-oxidatzaileak gora egingo du eta iskemiak izateko arriskua areagotzen da. Berriki argitaratutako lanek nNOS-en desregulazioa oxido nitrikoaren (NO) produkzio igoerarekin eta proteinen S-nitrosilazioarekin lotzen dute. S-nitrosilazio bidez ematen diren adierazpen ondorengo aldaketa hauek proteinen funtzioan eta aktibitatean aldaketak sor ditzakete (Nakamura et al., 2013). Besteak beste, rianodina-hartzaile, RyR,

izeneko kaltzio-kanalak nitrosilazio eta fosforilazio bidez eraldatuta daudela deskribatu izan da DMDn. Aldaketa hauek direla eta, RyR ezin da behar bezala itxi eta honek SR-tik kaltzio-jarioak areagotzea dakar (Bellinger et al., 2008).

Bestalde, distrofina zelula-sateliteetan, muskulu helduan dauden eta ia zitoplasmarik gabeko zelula multipotente txikiak, ere adierazten dela baieztatu dute, eta zelulen polarizazioa eta zatiketa asimetrikoa erregulatzen dituela uste da (Dumont & Rudnicki, 2016). Zatiketa asimetrikoan zelula-sateliteak zatitzen dira, ama-zelula eta zelula-progenitoreak sortuz. Duchenne muskulu-distrofian zelulen polaritatea kaltetuta egon daitekeela uste da, mitosian anomaliak sortuz, eta, ondorioz, zelula-progenitoreen sorkuntza kaltetua dago eta gihar distrofikoek birsortzeko gaitasuna gutxituta dute (Chang, Chevalier, & Rudnicki, 2016).

Azkenik, distrofinaren gainerako isoforma laburragoen gabeziak ere kognizio-arazoak sortzen dituztela frogatu dute (Doorenweerd, Dumas, et al., 2017), baina ez da prozesu patologikoaren inguruan askorik ezagutzen, oraindik isoforma hauen funtzioak zehaztu gabe daude eta.

Tratamenduak

Oraindik ez dago Duchenne muskulu-distrofia sendatzeko tratamendurik. Dena den, sintomak murriztu eta bizi-kalitatea hobetu dezaketen hainbat terapia daude.

Giharren degenerazioa atzeratzeko gehien erabili izan den tratamendu farmazeutikoa kortikosteroideen erabilera da, prednisone, nahiz eta, gaur egun, gurasoen esku dagoen hormona hauek ematea, sortu ditzakeen albo-kalteak direla eta (McDonald et al., 2018). Kortikosteroideak esteroide katabolikoak dira eta euren funtzioa hantura edo inflamazioa gutxitzea da. DMD duten gaixoei, giharren degenerazio progresiboa dela eta, hantura kronikoa dute, eta honek giharren birsorkuntza oztopatzen du. Tratamendu hau hasteko adinik egokiena 4-6 urte artean da, oraindik mugimendu-funtzioa egonkorra denean, mugikortasunak okerrera egin aurretik, hain zuzen. Kortikoideek mugimenduen galera atzeratzeaz gain, eskoliosia izateko arriskua murrizten dute, eta badirudi arazo kardiakoak zein arnasketakoak gutxitzen dituztela. Tratamendu hormonal honek hainbat eragin izan ditzake pertsona bakoitzean, eta, litekeena da dosi altuko administrazio kroniko baten ondoren albo-kalteak pairatzea, esaterako, obesitatea, kataratak eta hezurdura are eta gehiago ahultzea. Dena den, oraingoz, gehiago dira alde onak txarrak baino, eta horregatik mediku gehienek euren erabilera aholkatzen dute.

SARRERA

Laguntza-neurri garrantzitsuenak fisioterapia eta psikomotrizitatearen lanketa dira. Gaixotasuna diagnostikatu bezain laster, fisioterapiarekin hastea beharrezkoa da; giharren mugikortasuna landu behar da, ariketen bidez giharrak luzatu, uzkurdurak edo kontrakturak ekidin eta indar muskularra mantentzeko (Deconinck & Dan, 2007). Fisioterapeutarekin izango dituzten asteroko saioez gain, beste mota bateko terapiak ere aholkatzen dira. Adibidez, igeriketa edo hidroterapia egitea lagungarria da psikomotrizitatea lantzeko, eta haurrek gustuko izaten duten ariketa izan ohi da. Orobat, hipikaren bidez, hipoterapia delakoa garatzen dute, eta horrela enborreko eta pelbiseko giharrak sendotzen dituzte. Helburua giharren mugikortasuna eta funtzionalitatea ahalik eta denbora luzeenean mantentzea izango da. Hala eta guztiz ere, kasu askotan, ebakuntzak behar izaten dituzte, besteak beste, Akilesen tendoiazen uzkurdura dela eta, edo, sarriago, eskoliosiagatik.

Arlo soziala ere landu beharrezkoa da. Gaixo batzuek hitz egiteko arazoak dituztenez, logopedaren arreta beharko dute. Psikologoaren laguntza ere ezinbestekoa da, izan ere, haur hauek ahalik eta bizimodu duinena izateko helburuarekin, independentzia eta garapen soziala izan dezaten sustatu behar da. Egoerari aurre egiteko laguntza behar izaten dute, batez ere, haur izatetik heldu bihurtzerako etapan, non gaixotasuna okerrera doan atzera bueltarik gabe (Bushby et al., 2010a).

Gainera, mugikortasuna galtzen duten heinean, beharrezkoa izango da elikadura kontrolatzea, gehiegizko pisua har ez dezaten. Ildo beretik, gaixotasunak aurrera egin ahala, disfagia edo elikagaiak irensteko zailtasuna izan dezakete.

Eta, noski, beharrezkoa da mediku-jarraipena egitea, konplikazioei aurre egin ahal izateko. Diagnostika izatearekin batera, immunizazio-programa betetzen dutela ziurtatu behar da. Txerto guztiak izatea garrantzitsua da, infekzioek besteei baino kalte handiagoa egin diezaiekete eta. Gainera, ekokardiograma bidez bihotzaren funtzionamendua aztertu behar da. Sintomak gero eta latzagoak direnean, beharrezkoa izango da maiztasun handiarekin arnasketa-aparatuaren eta bihotzaren azterketak egitea. Garrantzitsua da bihotzeko alterazio arinak ahalik eta azkarren detektatzea, tratamenduarekin lehen bai lehen hasteko. Azpimarratzekoa da endekapen kardiakoa ez dela zertan endekapen muskularraren eboluzioarekin lotuta egon beharrik.

Gaixotasun honek duen sintomatologia zabalagatik, oso garrantzitsua da arlo ezberdinetako mediku eta espezialistek modu integratuan lan egitea eta tratamendu multidisziplinarra eskaintzea. Baina oraindik osasun-zerbitzuek ez dute lan egiteko estrategia hau barneratu, eta honek, sarritan, zailtasunak ekar ditzake gaixotasunaren

progresioan. Gainera, DMD kasuak ezberdinak dira euren artean, eta beraz, gaixo bakoitzak behar jakin batzuk izango ditu. Beraz, talde multidisziplinari bat arduratu beharko litzateke DMD gaixoei arreta eskaintzeaz, eta hauek modu koordinatuan lan egiteak asko erraztuko luke gaixo hauen bizimodua. Ondorengo espezialistek parte hartu beharko lukete talde honetan: neurologoak, pediatrak, fisioterapeutak, nutrizionistak, endokrinologoak, gastroenterologoak, ortopedistak, zirujauak, odontologoak, errehabilitatzaileak, pneumologoak, kardiologoak, genetistak, logopedak, psikologoak eta terapeuta okupazionalak (Bushby et al., 2010b). Mundu mailan hainbat asoziazio daude gaixoei eta batez ere familiei zuzenduak, besteak beste *Duchenne Parent Project* (<https://www.duchenne-spain.org/>). Hauen helburu nagusia gaixoen eta euren familien bizi-kalitatea hobetzea da eta DMDren ikerkuntza sustatzeko lan handia egiten dute.

Ikerketa

Ikerketa estrategiak

Esan bezala, DMD gaixotasunak ez du sendabiderik eta orain arte erabili diren tratamenduek sintomak atzeratu edo arintzeko baino ez dute balio. Horregatik, mundu mailan gaixotasun hau ikertzen duten talde asko daude. Gaixotasunari aurre egiteko borrokan bi estrategia nagusi daude: distrofina berrezartzea eta gaixotasunaren ondorioz kaltetuta dauden bide eta mekanismoetan eragitea (Blat & Blat, 2015).

Distrofina proteinaren adierazpena berriro ahalbidetzeko modu ezberdinak egon daitezke. *Exon skipping* deituriko formularen bitartez mutazioa kokatuta dagoen exonari jauzi egitea da helburua, distrofina laburrago baina partzialki funtzionala lortzeko, BMD duten gaixoen moduko DYST proteina hain zuzen. *Antisense* oligonukleotidoak erabiltzen dira mutazioa duten exonetan lotu daitezela eta genearen mutazio-guneak blokeatzen dira, irakurketa-marko egokia berreskuratuz. Eteplirsen 51. exonari jauzi egiteko diseinatutako molekula da, DMD gaixoen % 13rentzat izango litzateke onuragarria. FDAren (*Food and Drug Administration*) agentziak baldintzapean onartutako droga da eta III. berrespen-fasean dago gaur egun. Ez da onura argirik ikusi orain arte eta 2021 urteraino itxaron behar da behin betiko emaitzak izateko; gainera, EMAk (*European Medicines Agency*) ez du droga hau onartu. Exon jauzietan oinarrituta sintetizatu diren beste zenbait molekula ere entsegu klinikoetako fase ezberdinetan daude (45, 51 eta 53.

exonak dituzte jomugan) (Shimizu-Motohashi et al., 2019; Verhaart & Aartsma-Rus, 2019).

Distrofinaren defizit primarioari aurre egiteko beste lerro bat *stop codon readthrough* izenekoa da. *Nonsense* mutazioei aurre egiteko diseinatu da eta gaixoen % 13rentzat izango litzateke baliagarria. Hauek nukleotido bakarreko mutazioak dira baina kodon normal bat stop-kodonean bilakatzen dute, kasu honetan ez dago aldaketarik irakurtarauan, baina proteinaren sintesia behar baino lehen amaitzen da. Ataluren izeneko molekulak erribosomaren sentikortasuna jaisten du stop-kodon goiztiarrekiko, eta proteinaren itzulpenak jarraitu egin dezake. Droga hau III. berrespen-fasean dago eta 2021 urteraino itxaron behar da, kasu honetan MEAk baldintzapean onartu du eta FDAk ez, oraingoz ez delako onura esanguratsurik ikusi (Shimizu-Motohashi et al., 2019; Verhaart & Aartsma-Rus, 2019).

Gene-terapia bidez distrofinaren kopia zuzena txertatzeko helburuarekin lan egiten dute talde ugari. Geneak transferitzeko birusak erabili izan dira, birusek euren material genetikoa ostalarien genomatik txertatzeko dituzten mekanismoez baliatuz. Honela, genearen kopia zuzenak mutazioa duena ordezkatzeko luke, gaixotasunari erroitik aurre eginez. Dena den, gene-terapiak funtzionatzea ez da batere erraza. Batetik, distrofinaren genearen tamaina handiak gene-transferentzia zaildu egiten du. Horregatik, partzialki funtzionalak diren, baina tamaina txikiagoa duten mikro eta minidistrofinekin lanean dihardute, DMDren fenotipoa izatetik Becker muskulu-distrofia dutenen fenotipoa izatera pasako lirateke honela gaixoak. Bestetik, genea soilik gihar-zeluletara banatzea eta honen kontrako erantzun immunologikorik ez izatea gairatu beharreko oztopoak dira oraindik. Egun, AAV, birus adenoasoziatuak eta mikrodistrofina erabiliz egiten ari diren zenbait ikerketa II. fase klinikoan daude. Hobekuntza nabarmenak ikusi dira tratatutako gaixoen giharren funtzioan, baina, aipatzekoa da kortikosteroideak dosi altuan hartzen ari direla AAV-en kontrako erantzun immunea ekiditeko. Honela, lehendabizikoz, orain dela 30 urte gene-terapiaren ideia garatzen hasi zirenetik, mikrodistrofina adierazpen maila altuak lortu dira giharrean, eta estrategia honek funtzionatu dezakeela uste da (Verhaart & Aartsma-Rus, 2019). Dena den, honekin gaixoak ez dira guztiz sendatuko, distrofina soilik partzialki funtzionala baita, eta, gainera, paziente guztietan ez du ongi funtzionatzen, gaixo batzuk bektorearen edo distrofina beraren aurkako erantzun immunologikoa garatuko dutelako.

Ama-zelulen terapia hasieratik landu den estrategia izan da, emaile osasuntsu baten ama-zelulak hartu, *in vitro* hazi eta gaixoen giharretan transplantatzea zen ideia. Baina

ez du espero bezala funtzionatu, giharra oso ehun handia delako, ama-zelulen ugaltze-gaitasuna mugatua delako, eta transplantatutako zelulak ez direlako giharretara joaten (Verhaart & Aartsma-Rus, 2019). Ildo berari jarraituz, alternatiba bezala **mioblastoekin** lan egiten ari dira, nukleo bakarreko gihar-zelula goiztiarrekin alegia, zelula hauek zuzenean giharretan injekzio bidez administratuz. Ikerketa hauek entsegu klinikoko II. fasean daude, eta distrofinaren adierazpena berrezartzen dela ikusi da, baina soilik injekzioa egindako esparru txikian eta oso eraginkortasun baxua dutela dirudi (Verhaart & Aartsma-Rus, 2019).

Azkenaldian, **iPSC** (*induced pluripotent stem cells*) eta **genoma-edizioan** lortutako aurrerapausoei esker, CRISPR-Cas9 teknika, formula berriak garatzen ari dira. Honela, gaixoen zelulak hartu, iPSC bihurtu, genoma-edizio bidez zuzendu, giharreko zelula aitzindariak lortu eta berriro gaixoetan txertatzea da ikertzen ari diren estrategia (Young et al., 2017). Lan hauek hastapenetan daude eta, egun, ez dago entsegu klinikorik martxan.

Bigarren estrategia nagusiari dagokionez, gaixotasunaren ondorioz kaltetuta dauden bidezidor eta mekanismoetan eragiteko ere bide ezberdinak jorratzen ari dira. Ondoren azalduko diren terapiak entsegu klinikoetako fase ezberdinetan daudenak dira. Terapia ezberdinek hurrengo helburuak edo ituak dituzte: fibrosiari aurre egitea (adibidez estrogeno-hartzailearen modulatzaileraren den tamoxifenekin), giharren birsortzean laguntzea (givinostat histona deazetilasa inhibitzailearekin), hanturari aurre egitea (prednisone eta deflazacort bezalako kortikosteroideak erabiliz), gihar-zelulen hazkundea sustatzea (miostatina inhibituz), kaltzio homeostasia laguntzea (idebenone antioxidatzaileen bidez besteak beste), basodilatazioa sustatzea (sildenafil eta tadalafil erabilita adibidez), kardiomiopatiari aurre egitea (nebivolol deituriko $\beta 1$ hartzaileraren antagonistarekin), mitokondriaren funtzionamendua hobetzea (epigallocatechin gallate), osteoporosia ekiditea (azido zoledronikoa erabilita) eta utrofinaren adierazpena areagotzea (ezetromid-ekin distrofinaren antzeko funtzioa duen proteinaren adierazpena emendatuta) (Verhaart & Aartsma-Rus, 2019).

Dena den, azpimarratzekoa da bigarren mailako patologia jomugatzat duten terapiak kaltetutako bide edo mekanismo bakan batzuei soilik eragiten dietela, eta nahiz eta gaixotasunaren progresioa moteldu dezaketen, terapia konbinaturik gabe ezinezkoa dirudi prozesu patologikoa gelditzea.

Animalia-ereduak

Zenbait oinarrizko ikerketa eta konposatuen baheketetarako zelula edo ehun-kultiboak erabili daitezkeen arren, animalien erabilera ezinbestekoa da, gaur egun, DMDrako potentzial terapeutikoa duten tratamenduak aztertzeko.

Animalia-eredu desberdinak daude erabilgarri, horietako batzuk berezko mutazioak dituzte eta, beste batzuk, laborategian sortutakoak dira. Orain arte gehien erabili izan den animalia-eredua **mdx sagua** izan da, 3.000 lan inguru argitaratu dira sagu-eredu hau erabiliz. Sagu honek *nonsense* mutazio bat du saguen *dmd* geneko 23. exonean, hau da, kodoi arrunt bat stop kodoi goiztiar bihurtzen duen nukleotido bakarreko aldaketa du, eta beraz, mdx sagua ez da distrofina sortzeko gai (Sicinski et al., 1986). Hala ere, sagu honen fenotipoa ez da gizakiena bezain larria, eta gaixotasunaren hastapeneko etapan hainbat antzekotasun histologiko eta biokimiko erakusten baditu ere, gihar nekrotikoak dituzte eta odolean CK maila altua, mdx saguek ez dute muskulu-distrofiaren manifestazio kliniko argirik eta biziraupenaren murrizketa oso txikia da (Wells, 2018). 3 eta 6 asteko adinen artean izaten dute fenotipo agerikoena, giharretan nekrosi-birsortze prozesuak ematen dira orduan. Ondoren, gihar eskeletiko gehienak egonkor mantentzen dira, izan ere mdx saguek birsortze-gaitasun handia dute, baina, giharretan indar gutxiago dutela ikusi da (Luca, 2008). Salbuespen bakarra diafragma da, arnasketarako ezinbestekoa den gihar honetan degenerazio progresiboa ikusi daiteke mdx saguetan, DMD duten gaixoetan atzeman daitekeen bezala. Honela, mdx saguetan fenotipo distrofiko larria ikusteko, hots, giharren ahultasuna, eskoliosia edo kardiomiopatia, 15 hilabeteko adineraino itxaron behar da (McGreevy et al., 2015). *Treat-NMD Newtork*-ek baditu hainbat protokolo estandarizatu mdx saguekin lan egin eta kontrolekin alderatzean desberdintasunak ikusi eta tratamendu ezberdinak probatzeko; honela, laborategien arteko aldakortasuna gutxitzea eta emaitza fidagarriak lortzea da helburua.

Mdx saguen fenotipo arina ulertzeko hainbat arrazoi daude. Batetik, sagu hauetan utrofinaren adierazpena igota dagoela ikusi da; gizakietan, aldiz, distrofinaren antzeko funtzioa duen proteina hau enbrioi-faseetan adierazten da soilik (Tinsley et al., 1998). Bestetik, zelula-sateliteen ugaritzea emendatuta dagoela ikusi da eta birsortze-gaitasuna askoz hobea da saguetan; agian, telomeroak luzeagoak dituztelako izan daiteke (Sacco et al., 2011).

Fenotipo larriagoa duten saguak lortzeko hainbat estrategia erabili izan dira eta transgeniko ezberdinak sortu dituzte, hala nola, oso fenotipo larria duten distrofina eta utrofinaren *knock out* bikoitza duten saguak eta telomero laburragoak dituzten mdx saguak. Kolonia hauen hazkundea askoz garestiagoa eta zailagoa da, eta komunitate zientifikoak oraindik ez du adierazgarritasun fisiologikoa baieztatu (Allen et al., 2015).

Dena den, oraindik orain mdx sagua da DMD gaixotasuna ikertzeko *gold standard*-a. Desabantaila argiak izan arren, beste hainbat eredu bezala, gaur egun farmako berriak identifikatzeko beharrezkoa da animalia-eredu honetan probatzea.

DMD txakurrek (cDMD) gizakien fenotipoarekin antzekotasun handiagoa dute. Serumean CK maila altua, gizakien antzeko patroi histopatologikoa, giharren ahultasun progresiboa eta gizakien moduko biziraupen laburra dituzte (McGreevy et al., 2015). Dena den, aldakortasun fenotipiko altua dute. Gainera, cDMD txakurkumeek hilkortasun-tasa altua dute eta koloniaren mantenua oso garestia da. Beraz, entsegu preklinikoetarako txakur hauen erabilera nahiko mugatua dago oraindik (Allen et al., 2015).

Azkenaldian geroz eta gehiago hedatzen ari den animalia-eredua ***sapje* zebra-arraina** da. Distrofina genearen ortologoan nukleotido bakarreko mutazioa du arrain honek, *sap^{ja222a}* (Bassett et al., 2003). *Sapje* arrain-zebrek giharren desantolaketa, motore-funtzioaren degenerazioa eta heriotza goiztiarra izaten dute, ernalketa ondorengo 10-12 egunetara (dpf: *days post fertilization*) (Waugh et al., 2014); beraz, mdx saguek baino hobeto adierazten dute DMD duten gizakien fenotipoa. Giharren desantolaketa argi polarizatu batekin bereizten den birrefringentzia bidez ikusi daiteke *sapje* larbetan 3-4 egunetara (Widrick et al., 2016). Beste animalia-ereduekin alderatuta abantaila ugari ditu, tamaina txikia, maiz ondorengo ugari sortzeko gaitasuna, enbrioien gardentasuna eta mantenu-kostu baxuak besteak beste (Lipscomb, Piggott, Emmerson, & Winder, 2016). Honela, *sapje* zebra-arraina eredu eraginkorra da drogen baheketa masiboetarako (G. Kawahara et al., 2011; Genri Kawahara & Kunkel, 2013; Waugh et al., 2014).

RyR-KALSTABINA LOTURA DUCHENNE MUSKULU-DISTROFIAN

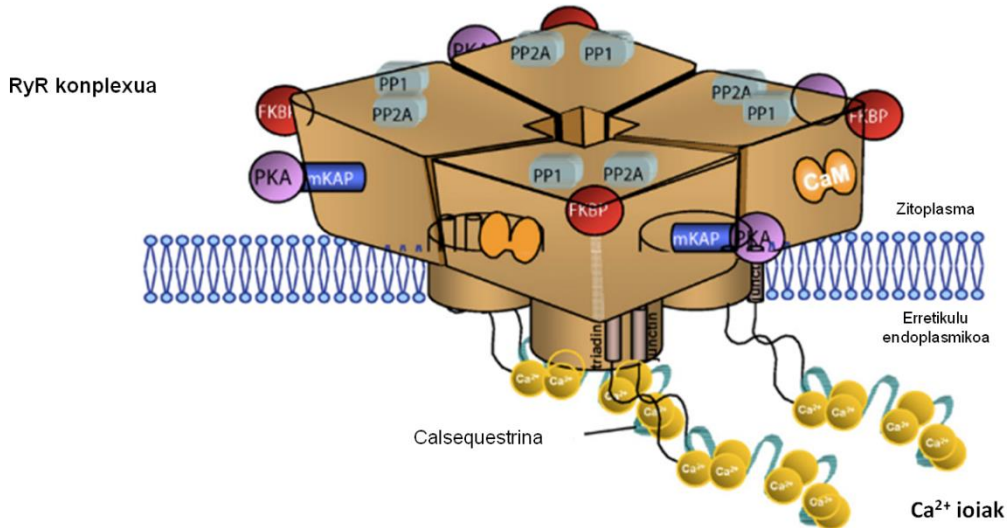
Atal honetan rianodina-hartzaile izeneko kaltzio-kanalak deskribatuko dira eta hauek Duchenne muskulu-distrofiaren duten rola aztertuko da.

RyR kaltzio-kanalak eta kalstabina

Rianodina-hartzailea, RyR, erretikulu endoplasmikoan (ER) kokatzen den kaltzio-kanala da, erretikulutik zitoplasmara kaltzioaren irteera ahalbidetzen duena. Rianodina-hartzailearen hiru isoforma daude: RyR1, RyR2 eta RyR3. Giharretan RyR1 gailentzen da, bihotzean RyR2 eta garunean hiru isoformak daude (Del Prete, Checler, & Chami, 2014).

RyR 560 kDa-eko lau azpiunitate berdinez osaturiko konplexu tetramerikoa da, eta "perretxiko" forma hartzen du 7. irudian ikusi daitekeen bezala (des Georges et al., 2016). Dena den, erregulatuak diren hainbat proteinentzat aldazio gisa ere jokatzen du. Hiru domeinu nagusi ditu: luminala, erretikuluko mintzekoa eta zitoplasmakoa. Zitoplasma aldean kokatuta dauden kalstabina (FKBP) eta calmodulina (CaM) izeneko proteina txikiekin konplexu multimolekularra osatzen du. Kalstabina RyR-en azpiunitate bakoitzarekin lotzen da afinitate altuarekin eta kanalaren konformazio itxia egonkortzen du. CaM proteinaren funtzionamendua konplexuagoa da, isoforma eta kontzentrazioaren baitan efektu ezberdina eragiten baitu, baina, funtsean, RyR-en aktibazioan parte hartzen du. Alde luminalan, hots, erretikulu endoplasmiko barnealdera kokatuta, rianodina-hartzailea triadina, junctina eta calsequestrinak osatzen duten konplexuarekin lotuta dago; konplexu hau kaltzio-sentsorea da (Nikolaienko, Bovo, & Zima, 2018). Gainera, badirudi RyR tetramero bakoitza bizilagun dituen beste zenbait RyR-ekin kontaktuan dagoela interakzio-matrize bat osatuz (des Georges et al., 2016). Halaber, kaltzio zitosoliko eta luminalak berak erregulatu dezake RyR-en aktibitatea: zitoplasmako kaltzio-kontzentrazioa baxuak RyR aktibatu eta irekitzen du afinitate altuko gunetan lotuz, eta kontzentrazioa altuak, aldiz, RyR konformazio itxian mantentzen du kaltzioa afinitate baxuko gunetara lotuz; kaltzio-kontzentrazio luminala igotzen denean berriz RyR aktibatzen da (SOICR: *store-overload-induced Ca²⁺ release*) (Van Petegem, 2015). Fosforilazioa ere RyR-ak erregulatzeko beste mekanismo bat da, hainbat kinasak

(PKA, CaMKII) eta fosfatasa (PP1, PP2A eta PDE3D) daude rianodina-hartzaileetan eragiten dutenak; baina baldintza fisiologikoetan ez ezik, baldintza patologikoetan ere rol garrantzitsua dute RyR-eko fosforilazioek (Nikolaienko et al., 2018).



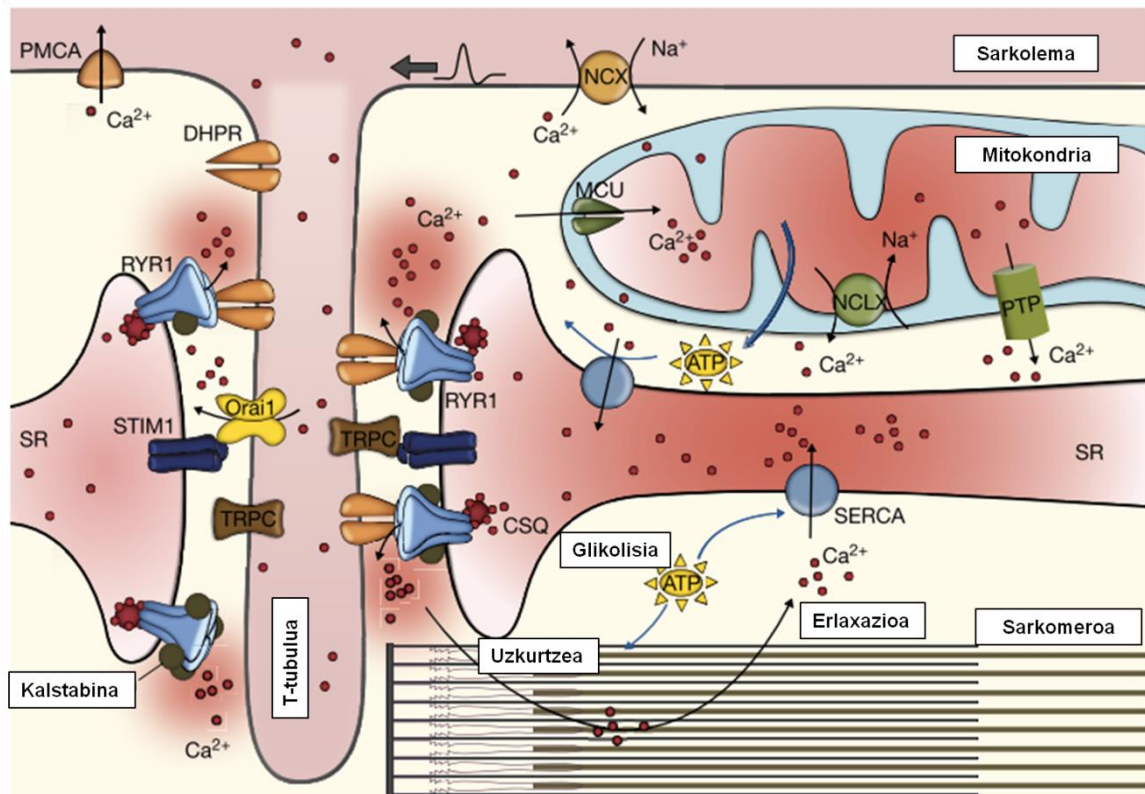
7. IRUDIA. RyR konplexua. Rianodina-hartzaileari lotuta dauden proteinak ondorengoak dira: calmodulina (CaM), kalstabina (FKBP), proteina kinasa (PKA) eta fosfatasak (PP1, PP2A) zitoplasmako zatian eta triadina, juntina eta calsequestrina erretikulu endoplasmikoko zatian (Yano, Yamamoto, Kobayashi, & Matsuzaki, 2009).

FKBP12 (kalstabina 1) eta FKBP12.6 (kalstabina 2) FK506-ra lortzen diren proteinen familiako molekulak dira (*FK506 binding protein 12/12.6*), aurrenekoa giharretan kokatzen da nagusiki eta bigarrena bihotzean. Bi isoformak oso antzekoak dira estruktura aldetik eta biak FK506 zein rapamycin izeneko immunosupresoretara lotzen dira, droga hauen presentzian bahituta geldituz (Van Petegem, 2015). Gainera, aurrez aipatu den bezala, RyR kaltzio-kanalera lotzen dira, zehazki N-terminala eta domeinu zentralaren artean, hauen irekitze-ixte mekanismoan funtsezko rola dutelarik. Hasiera batean FKBP12 giharretako RyR1-era lotzen zela uste zen eta FKBP12.6 bihotzeko RyR2 isoformara, baina berriki argitaratutako lanen arabera badirudi bi kalstabinak bi gihar motetan adierazten direla eta bi rianodina-hartzaileetan eragiteko gaitasuna dutela (Venturi et al., 2014). Arestian esan den moduan, kalstabinak RyR-en konformazio itxia egonkortzen du, eta, beraz, kalstabina lotuta ez dutenean kaltzio-jarioak egoteko arriskua dago. Arrisku hau areagotzen dute RyR-ean itzulpen ondorengo zenbait aldaketek, kalstabina eta RyR-aren arteko elkarrekintza afinitatea jaitsi edo deuseztatzen dute eta (O'Brien, Venturi, & Sitsapesan, 2015). Gainera, kalstabinak sarkolemako RyR multzoaren sinkronizazioan

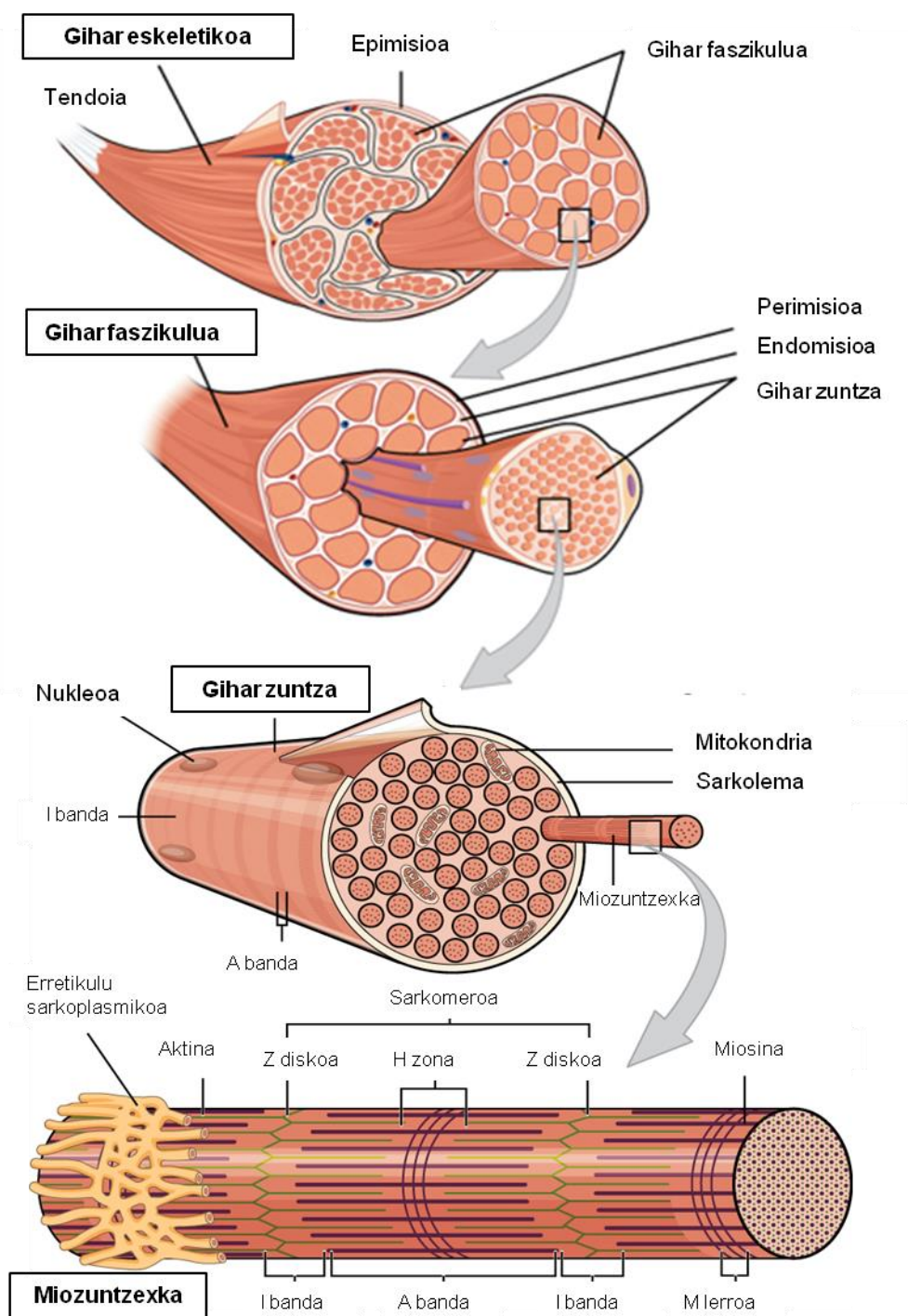
laguntzen du, kaltzio-kanal hauek aldi berean irekitzen alegia. Rianodina-hartzaileak dihidropiridina-hartzaileen, DHPR, bidez aktibatzen dira giharretan, zenbait RyR DHPR-rekin lotuta daudelako; baina lotuta ez dauden RyR kaltzio-kanala sinkronizatzen laguntzen du kalstabinak (Zhao et al., 2017). Hortaz, RyR kaltzio-kanalen eta kalstabinaren arteko elkarrekintzak kaltzioaren homeostasian funtsezko rola betetzen du.

RyR1 eta gihar eskeletikoaren funtzionamendua

Giharren uzkurduan RyR1-en aktibitatea potentzial-diferentziak induzitutako Ca^{2+} askapena bezala definitzen da. Neuromuskulu-lotune izeneko gunean neurona motoreek aktibazio seinalea helarazten diete azetilkolina daramaten sinapsi-besikula bidez gihar zuntzei; honela, Na^+/K^+ kanalak irekitzen dira mintzean zehar potentzial-diferentzia hedatuz. Dihidropiridina (DHPR) gihar-zelulen mintzeko potentzial-diferentziaren sentsorea da eta seinale hau RyR1-i helarazten dio, konformazioa aldatu, RyR1 ireki eta kaltzioa erretikulutik zitoplasmara atera dadin. DHPR bidez aktibatzen diren RyR1-ak interakzio fisikoa dute DHPR kanalekin, eta horregatik daude t-tubuluan parez pare kokatuta. T-tubulua sarkolemak edo gihar-zelulen mintzak erretikulu sarkoplasmikoarekin (SR) kontaktuan egoteko hartzen duen itxura da, inbaginazio modukoa, eta albo banatan SR-ren zisterna terminalak dituela triada izeneko egitura anatomikoa osatzen dute (8. IRUDIA) (Kossmann & FAWCETT, 1961). Gihar-zelulak multinukleatuak dira eta euren zitoskeletoa miozuntzekek eratzen dute, eta horietako bakoitza sarkomeroz osatuta dago; hauek aktina eta miosina harizpiak dituzten giharren kontrakzio-unitateak dira (9. IRUDIA). Giharrak erlaxatuta daudenean tropomiosinak aktinako lotune-guneak blokeatzen ditu eta miosina ezingo da bertara lotu. Baina neurona motoreen seinalea kaltzio bidez iristen denean RyR1-ak aktibatu eta guztiak sinkronizatzen dira Ca^{2+} trantsiente bat sortuz; kaltzio hau miozuntzeketara doa, zehazki troponinara lotuko da, eta honek tropomiosina mugituko du aktinako lotune-guneetatik. ATPari esker miosina aktinako lotune-guneetara helduko da, eta lotune-gune hauetatik mugituz sarkomeroak, gihar-zuntzen unitate kontraktilak, laburtuz joango dira gihar osoaren uzkurtzea eraginez; uzkurtze hau indarrean eta kasu batzuetan mugimenduan bihurtuko da. SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase*) bonben bidez kaltzioa berriro erretikuluetara sartuko da giharrak erlaxatuz. (OpenStax, Anatomy & Physiology, 2016).



8. IRUDIA. Kaltzioaren seinalizazioa gihar-zuntzetan. T-tubulua eta alboz albo dauden 2 erretikulu sarkoplasmiko (SR) zisternetan kaltzioaren dinamikan parte hartzen duten proteinen irudia egokitu da (Vallejo-Illarramendi, Toral-Ojeda, Aldanondo, & López de Munain, 2014).

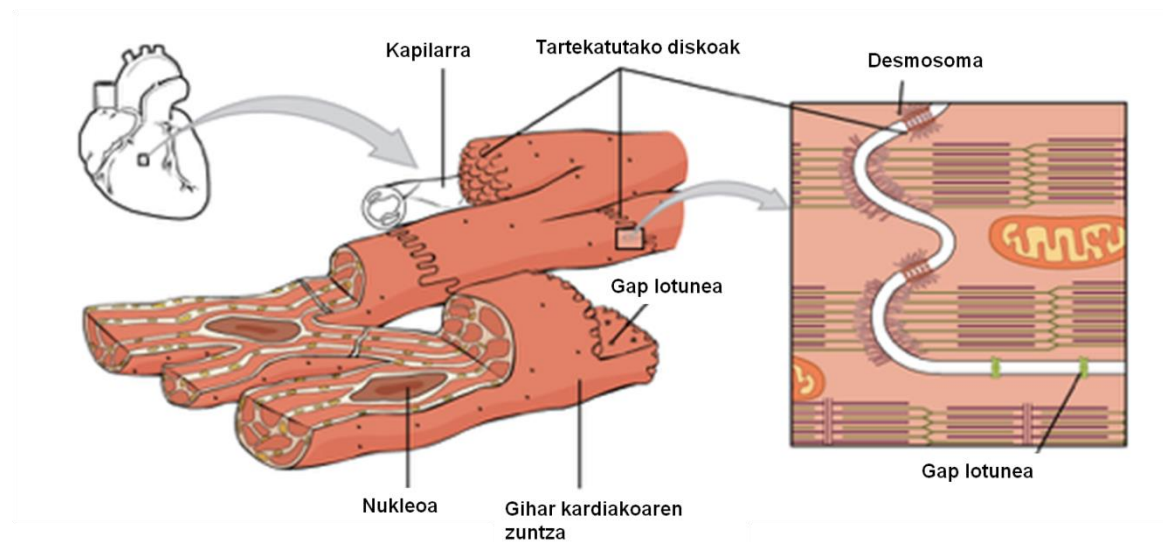


9. IRUDIA. Giharren egitura gihar eskeletikotik miozuntzeketara. Egokitutako irudia (OpenStax, Anatomy & Physiology, 2016).

RyR2 eta gihar kardiakoaren funtzionamendua

Gihar kardiakoak odola bihotzetik zirkulazio-sistema osora zabaltzen du oso sinkronizatuta dagoen mekanismo bidez. Gihar eskeletikoaren antzera, muskulu ildaskatua da bihotzekoa eta sarkomeroetan antolatutako miozuntzekak ditu, baina,

bihotzeko gihar-zuntzak laburragoak dira eta erdialdean kokatutako nukleo bakarra dute. Adarkatuta bezala, tartekatutako diskoak osatuz lotzen dira zelula kardiakoak bata bestearekin; estruktura honek olatu moduko patroia bidez kitzikatzea ahalbidetzen die eta, honela, bihotzak bonba batek bezala lan egiteko ahalmena du. Tartekatutako diskoak sarkolemaren parte dira eta bi estruktura garrantzitsu dituzte: gap lotuneak eta desmosomak. Gap lotuneak ondoz ondoko kardiomiotoen arteko kanalak dira, eta ioiek sortutako potentzial-diferentzia batetik bestera garraiatzen dute. Desmosomak aingura modukoak dira eta kardiomiotoak elkarrekin lotzen dituzte uzkuertzean banandu ez daitezkeen (OpenStax, Anatomy & Physiology, 2016).



10. IRUDIA. Gihar kardiakoa. Tartekatutako diskoak kardiomiotoetako sarkolemaren parte dira eta gap lotuneak zein desmosomak dituzte. Egokitutako irudia (OpenStax, Anatomy & Physiology, 2016).

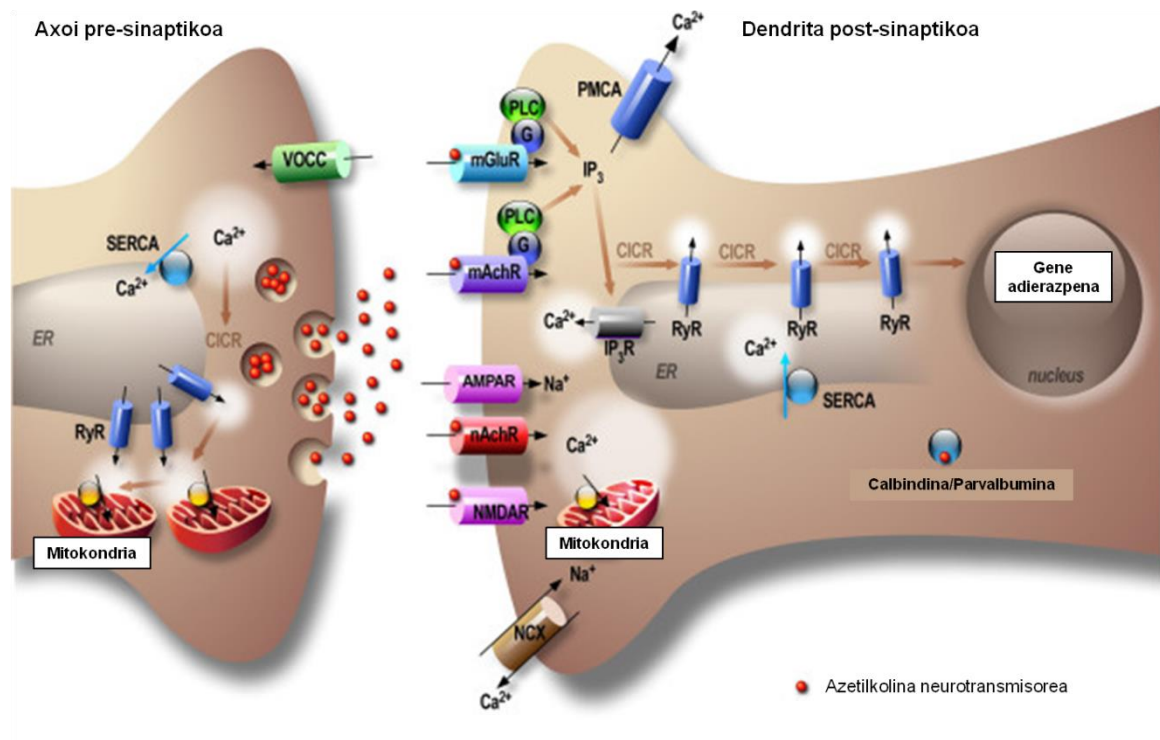
Muskulu kardiakoan RyR2-ren aktibitatea kaltzioak berak induzitutako Ca^{2+} askapena bezala definitzen da (CICR: *calcium induced calcium release*). Taupada-markagailu lana duten zelulek sortzen dute akzio-potentziala, eta hau t-tubulutik garraiatuko da, kardiomioto mononukleatuen mintzaren despolarizazioa eta kaltzio-sarrera eraginez DHPR eta NCX $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ trukatzailen bidez. Zitosolera sartutako kaltzio-fluxuak RyR2 aktibatzen du, konformazioa aldatu, eta RyR2 irekitzen da kaltzioa erretikulutik atera dadin (Nikolaienko et al., 2018). Kasu honetan, giharrean ez bezala, ez dago DHPR eta RyR2-ren artean interakzio fisikorik, eta horregatik, kaltzio-kanal hauen antolaketa ez da horren erregularra bihotzeko zeluletan; nahiz eta hemen ere t-tubuluak dauden diada izeneko estruktura osatzen SR terminal bakarrarekin (Van Petegem, 2015). Sistolean SR-ren lotuneetan dauden RyR2 kluster bat aktibatuko da lehendabizi, kaltzioa zitosolera

ateraz *spark* edo txinparta modura; era berean, kaltzio honek gainerako zenbait RyR2 aktibatuko ditu, azkenean denbora eta espazio berean sortutako milaka txinparten ondorioz Ca^{2+} trantsitorio global bat jazoko da eta uzkuetze-prozesua emango da (Nikolaienko et al., 2018). Zehazki zitoplasmako kaltzioa troponinari lotuko zaio, honek tropomiosina konplexua kenduko du aktinaren lotune-gunetik, eta miosina aktinara lotzea ahalbidetuko du. Puntu honetatik aurrera, giharren uzkuetze-prozesu berbera jarraitzen dute bihotzeko zelula uzkurgarriek. Diastolean zitosoleko Ca^{2+} berriro SR-ra sartuko da SERCA ATPasa bonben bidez eta zelulatik kanpo botako dute NCX izeneko $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ trukatzailleek.

RyR garunean

Garunean RyR-ren 3 isoformak daude. RyR1 zerebeloan eta Purkinje-zeluletan dago, RyR2 zerebeloko zein garuneko kortexeko Purkinje-zeluletan eta hipokanpoko giro dentalean adierazten da, eta RyR3, batez ere, hipokanpoan, ganglio basalean eta usaimen-bulboetan aurkitu daiteke (Del Prete et al., 2014).

Neuronen arteko sinapsia edo elkarrekintzan kaltzioak ere funtsezko lana du. Axoien bidez jasotako potentzial-diferentziak kaltzio-seinalizazioaren bidez neurotransmisoreen askapena eragiten du; tartean RyR-ek kaltzioaren seinalizazioan parte hartzen du. Dendritetako potentzia-diferentziak eragiteaz gain, gene adierazpenean eta plastizitate sinaptikoan eragina dute Ca^{2+} ioiek. Erretikulu endoplasmikoak (ER) sare jarrai eta mugikor bat osatzen du neuronan zehar, eta IP3R (inositol 1,4,5-trisfosfatoa) eta RyR dira bertatik kaltzioa ateratzearen arduradunak. Kasu honetan ere RyR-en aktibitatea kaltzioak berak induzitutako Ca^{2+} askapena bezala definitzen da (CICR).



11. IRUDIA. Kaltzioaren seinalizazioa neuronetan. Egokitutako irudia (Del Prete et al., 2014).

nNOS eta oxidazio-estresa DMDn

Distrofina-glikoproteina konplexuak (DGC) funtzio estrukturala du sarkolema kalte mekanikotik babestuz; baina, horrez gain, aldamio lana ere egiten du hainbat seinalizazio-proteinekin (Allen et al., 2015). Honela ba, distrofina proteina adierazten ez denean, DGC osatzen duten zenbait proteina dislokatuta ageri dira.

Oxido nitrikoa (NO) seinalizazio-modulatzaile garrantzitsua da giharreko hainbat prozesu fisiologiko eta patologiko zelularretan, hala nola, giharren uzkuetzean, metabolismoan, glukosa kontsumoan, zelula-sateliteen aktibazioan, hipertrofian, atrofian, basodilatazioan, lesioetan eta konponketetan (Kim, Kwak, Thompson, & Lawler, 2013). Horregatik, oxido nitrikoarekin lotutako edozein anomaliak aldaketak eragin ditzake giharretan. NO molekula oxido nitriko sintasak (NOS) sortzen du eta proteina honen 3 isoforma daude: neuronal (nNOS edo NOS1), induzitu daitekeena (iNOS edo NOS2) eta endoteliokoa (eNOS edo NOS3). Giharretan nagusiki nNOS adierazten da; hau sarkolemari lotuta dago eta bere lokalizazioa eta funtzionamendua, ziurrenik, DGC-rekin duen loturaren baitan daude. Beraz, distrofina gabe nNOS ez da sarkoleman ageri eta honek miopatia areagotu dezake: NAD(P)H oxidasaren aktibitatea emendatzen du, hantura igotzen du, proteinen degradazioan parte hartzen du ubikitina ligasak aktibatuz

eta kaltetutako zelula-sateliteen hazkundean laguntzen du (Tidball & Wehling-Henricks, 2007). Dena den, NO eta patologia distrofikoaren arteko elkarrekintza oso konplexua da, eta oraindik mekanismo zehatzak deskribatu behar badira ere, sarkoleman nNOS-en deslokalizazioak DMD gaixotasunaren patologia larriagotzen du distrofina ez izateak dakartzan beste zenbait defizitekin batera (Rando, 2001), besteak beste estres nitro-oxidatzailea emendatzen du. Gainera, bihotzeko zelulen patofisiologian nNOS-ek ere garrantzizko rola duela deskribatu izan da (Roselló-Lletí et al., 2016).

Distrofina ez izateak estres nitro-oxidatzailea areagotzen duela gauza jakina da; nahiz eta mekanismo zehatza ez den ezagutzen, kaltetuta dagoen sarkolematik sartzen den kaltzio-fluxuak eta hanturak eragina dutela uste da (Terrill et al., 2013). Duchenne muskulu-distrofian antioxidatzaileek ez dute behar bezala funtzionatzen eta oxigeno zein nitrogeno erradikal askeak (ROS eta RNS) emendatuta daude. Azken hauek hainbat molekuletan, hala nola, lipidoak, proteinak eta DNA bera, aldaketak eragin ditzakete (Kim et al., 2013).

DMDn ROS/RNSek RyR-en duen eragina

Baldintza fisiologikoetan ROS eta RNS-ak zelulen seinalizazio-prozesuen parte dira proteinen gune espezifikoetan proteinetan aldaketa itzulgarriak induzituz. Redox seinalizazioa oxigeno zein nitrogeno erradikal askeek proteinen zisteinak modulatzeko gaitasunean oinarritzen da, S-nitrosilazioa, S-glutationilazioa eta disulfidoen elkarrekintzak sortuz (S-S) (Giordano, 2005). Alabaina, ROS/RNS-en produkzioa antioxidatzaile intrazelularrena baino handiagoa denean, hau da, oreka galtzean, kalteak eragin ditzakete lipido, proteina eta DNAn, eta kontrolik gabeko baldintza hauetan ematen da estres nitro-oxidatzailea.

Rianodina-hartzaile deituriko kaltzio-kanaletan itzulpen ondorengo aldaketek eta zehazki estres oxidatzaile eta nitrosatzaileak eragina dutela deskribatuta dago (Bellinger et al., 2008). Nitrosilazio eta oxidazioek RyR-en funtzioa eta kaltzio-seinalizazioa modulatzeko dute. Giharretan adierazten den RyR1 isoformak 22 zisteina-hondar ditu, baldintza fisiologikoetan oxidazio, S-nitrosilazio eta S-glutationilazio bidez eraldatu daitezkeenak (Sun, Xu, Eu, Stamler, & Meissner, 2003). S-nitrosilazioek RyR eta kalstabina proteinen arteko lotura ahuldu eta deuseztatu dezakete, eta azken honek ezinbesteko funtzioa du kaltzio-kanalen konformazio itxia mantentzen; honela, RyR makromolekula-konplexuan egon daitezkeen aldaketek muskulu-distrofietako kaltzioaren kontzentrazio anormalarekin

lotura dutela ondorioztatu izan da (Bellinger et al., 2009). Gainera, badirudi kaltetutako RyR bidezko kaltzio-jario emendatuek eta mitokondrioen ROS produkzioak euren artean ziklo biziotsu bat osatzen dutela (Andersson et al., 2011). Hala ere, erabat argitu gabe dago ROS eta RNS-ek giharreko rianodina-hartzaileen funtzioan duten eragina. Duchenne muskulu-distrofiaren animalia-eredu diren mdx saguetan giharreko RyR1-ak hipernitrosilatuta daudela deskribatu izan dute (Bellinger et al., 2009), honek kalstabina deplezioa dakarrela baieztatu zuten eta RyR1-a gaizki itxita egotearen ondorioz kaltzio-jarioak daudela adierazi zuten. Honek uzkuarte-prozesuan eragina du eta giharren errendimendua jaisten du.

RyR2 izeneko isoforma da bihotzeko kardiomiotoetan ageri den rianodina-hartzailea. Kasu honetan ere, lan ezberdinek baieztatzen dute estres nitro-oxidatzaileak eraginda kanal hauek eraldatu daitezkeela euren funtzionamendua aldatuz; oxidazio-estresak patologia kardiakoetan erretikulu sarkoplasmikotik RyR2 hiperaktibo bidez irteten den kaltzio-jarioarekin lotura zuzena duela deskribatu izan da (Nikolaienko et al., 2018). Estresak RyR2-an eragindako aldaketak kalstabina dislokazioarekin lotuta daude, honen ondorioz rianodina-hartzaileak konformazio irekian gelditzen dira, kaltzio-jario espontaneo areagotuz eta bihotzaren uzkuarte-prozesuan kalteak eragin ditzake, izan ere, kaltzioaren homeostasia mantentzea funtsezko mekanismo zelularra da bihotzean (Andersson & Marks, 2011). RyR2-ak 21 zisteina-hondar ditu tiol askeekin redox erreakzioen bitartez eraldatu daitezkeenak, beraz, giharreko isoforma bezala, ioi-kanal sentitiboa da ROS/RNS bidezko eraldaketekiko (Nikolaienko et al., 2018). Mdx saguetan bihotzeko RyR2 isoformak ere itzulpen ondorengo aldaketak ditu, hala nola, S-nitrosilazioa, eta, RyR1-ekin deskribatu zuten bezala, kalstabina ez da rianodina-hartzaileara behar bezala lotzen, kanalak irekita mantenduz eta kaltzio-jarioa eraginez (Fauconnier et al., 2010).

Nerbio-sistema zentrolean ere, eta zehazki mdx saguen neuronetan, gihar ildaskatuetan (muskulu eskeletiko eta kardiakoan) gertatzen den bezala, distrofina ez izateak kaltzioaren homeostasian eragiten duela deskribatu izan da (Lopez et al., 2016). Beste lan batzuetan ere RyR jariakorrak kognizio arazoekin lotu izan dituzte (Liu et al., 2012), kasu horretan neuronetako rianodina-hartzaileak fosforilazio, oxidazio eta nitrosilazio bidez eraldatuta zeudela ikusi zuten eta RyR-kalstabina lotura askatuta zegoela. Berriki, mdx saguen hipokanpoko eta kortexeko neuronen kaltzio kontzentrazioak neurtu eta kontrolekin alderatu dituzte, eta distrofikoek Ca^{2+} maila altuagoa dutela ebatzi da. Lan honetan, RyR blokeatu eta kaltzio homeostasia hobetzen dela egiaztatzeaz gain, saguen funtzio kognitiboa ere hobetzen dela adierazi dute (Lopez et al., 2016).

DMDn RyR-en aktibitatea modulatzeko tratamenduak

Rianodina-hartzaile izeneko kaltzio-kanalek gihar ildaskatueta zein nerbio-sistema zentralerako zelula kitzikagarrietan duten rola ezagututa eta DMDn eraldatuta daudela jakinda, RyR-en funtzionamendu egokia berrezartzeak gaixotasunaren sintoma batzuk arindu ditzakeela uste da. Ondoren azalduko diren konposatuak DMDn kaltzioaren homeostasia berreskuratzen laguntzeko diseinatu dira RyR kaltzio-kanalak behar bezala itxiz.

Rycals®

Rycals izeneko konposatuak agente oral berriak dira zehazki RyR-kalstabina lotura egonkortzeko diseinatuak, RyR kaltetuta dagoen hainbat gaixotasunetan erretikulu endo/sarkoplasmikotik kaltzio-jarioa ekiditeko. Molekula txikiak dira eta Andrew R. Marks-en laborategian sortu zituzten Columbia unibertsitatean (New York). Rycals molekulak muskulu eskeletikoko eta kardiakoko hainbat gaixotasunentzat zein gaitz neurologikoentzat tratamendu gisa funtzionatzeko diseinatu dira; monoterapia zein terapia konbinatu bezala erabiltzeko. Egun, ARMGO Pharma konpainia biofarmazeutikoa da Rycals® konposatuen jabea eta Estatu Batuetatik zein Japoniatik kanpo Servier konpainia arduratzen da distribuzioaz (<http://www.armgo.com>).

S107 izeneko Rycals molekularekin hainbat lan argitaratu zituen Marks-en taldeak kolaboratzaile ezberdinekin. RyR estres nitro-oxidatzaileak eraginda aldatuta dagoen zenbait gaixotasunetan probatu izan dute S107 molekula. Bellinger-en lanean (2009) S107-k mdx saguen gihar eskeletikoan zituen hobekuntzak deskribatu zituzten eta urte bete beranduago Fauconnier-ek (2010) mdx saguen bihotzean ere fenotipoa hobetzen zuela adierazi zuten. DMDko animalia-ereduetan probatzeaz gain, beste zenbait gaixotasunetan zuen eragina ere ikertu zuten, besteak beste: disfuntzio kognitiboan (Liu et al., 2012), diafragmaren disfuntzioan (Matecki et al., 2014), zahartzean (Umanskaya et al., 2014), hezurren metastasian (Waning et al., 2015) eta diabetesean (Santulli, Xie, Reiken, & Marks, 2015). Alabaina, esperimendu preklinikoetan emaitza interesgarriak lortu diren arren, lehenengo fase klinikoetan S107 baztertu egin da, gibelean toxikotasun detektatu delako.

Gaur egun, ARM210/S48168 Rycals molekula berriarekin ari dira lanean eta hainbat entsegu prekliniko daude martxan. Molekula honekin egindako lehen argitalpena mdx saguekin egindako ikerketarena izan da, eta bertan hainbat hobekuntza deskribatu dituzte gihar eskeletiko mailan bi laborategi independenteetan egindako lanean (Capogrosso et al., 2018). Akzio-mekanismo eksklusiboari eta modu oralean administratzeko gaitasunari esker, ARM210-ek gihar eskeletikoan, diafragman eta bihotzean eragiteko gaitasuna duela uste dute eta DMDrako potentzial handiko terapia bezala deskribatzen dute (ARMGO Pharma).

AHK

AHK konposatuak Euskal Herriko Unibertsitateko Jesus Maria Aizpurua doktorearen taldearekin kolaborazioan diseinatu ziren, kalstabina (FKBP12/12.6) modulatu eta RyR-kalstabina lotura berrezartzeko helburuarekin. Rianodina-hartzailearen zisteina-hondar batzuk hipernitrosilatuta daude DMDn, eta horrek bereziki kalstabinarekin duen elkarrekintza ekiditen du. AHK familiako konposatuen helburua kalstabinak modulatu eta hipernitrosilatutako RyR-ekin lotu daitezten ahalbidetzea da. Molekula hauek patente baten babesean daude (P201630670, 24/05/16). AHK konposatuak triazolak dira eta pisu molekular baxua dute. Lipinski-ren 5 arauak betetzen dituzte, hau da, farmakoek aktibo izaten jarraitzeko bete beharreko baldintzak dituzte modu oralean administratu eta gero. Gainera, oso molekula egonkorak dira eta uretan disolbatu daitezke. Molekulen amarratzea *in silico* irudikatu ondoren diseinatu dira molekula hauek "click" sintesi bidez.

Aurrez laborategian eginiko ikerlan batean, Aldanondok 2017an aurkeztutako tesian hain zuzen (Aldanondo Aristizabal, 2017), jada hainbat AHK konposatu probatu ziren zelula eta DMDren eredu ezberdinetan. Batetik, AHK molekulen toxikotasuna eta mekanismoa egiaztatu zen sagu eta giza-eredu zelularretan. C2C12 (saguen giharretako zelulak) eta LHC (giza mioblasto, giharretako oinarritzko zelula, immortalizatuak) zeluletan AHK familiako molekulak toxikoak ez zirela ikusi zen. Gainera, SIN1, peroxinitrito emaile bat, gehitu eta gero LHC zeluletan RyR-kalstabina elkarrekintza berreskuratzen zela ikusi zen AHK molekulekin, mekanismoa egiaztatuz.

Bestetik, AHK1 eta AHK2 molekulek mdx saguean zuten eragina ikertu zen 5 asteko tratamenduen ondoren. Indar muskularra hobetzeaz gain, serumeko CK mailak jaisten zituela eta degenerazioa nolabait gelditzen zuela ikusi zuten, azken hau, diafragmetako

SARRERA

eta *tibialis anterior* muskuluko gihar-zuntzen nukleo zentralak zenbatuz. Gainera, mdx saguen oinetako FDB zuntzetan kaltzioa jaisten zutela egiaztatu zen.

Azkenik, distrofina isilduta duten (shDYST) LHC zeluletan, hau da, DMDren giza-eredu zelularretan, RyR-ek itzulpen ondorengo aldaketak zituela baieztatu zen, fosforilazioa eta nitrosilazioa besteak beste, eta Ca^{2+} kontzentrazioa emendatuta zutela ikusi zen. Giza-eredu zelularretako fenotipo distrofiko hau AHK1 eta AHK2rekin modulatzeko zela egiaztatu zen.

HIPOTESIA ETA HELBURUAK

AHK konposatuak (P201630670, 24/05/16) kalstabina birmoldatzeko diseinatu diren tamaina txikiko molekulak dira. FKBP edo kalstabina izeneko proteinak, rianodina-hartzaile (RyR) izeneko kaltzio-kanalak modu alosterikoan modulatu dituzte, beste zenbait funtzioen artean. Aurrez, Duchenne muskulu-distrofian, kalstabina eta RyR-en arteko elkarrekintza potentzial terapeutikoa duen diana gisa deskribatu izan da, izan ere, S107 molekula erabiliz giharretako RyR1 eta bihotzeko RyR2-ren funtzioa hobetzea lortu da DMDren animalia-ereduetan (Bellinger et al., 2009; Fauconnier et al., 2010). Lerro berean jarraituz, AHK familiako konposatuek, zehazki AHK1ek eta AHK2ak, kalstabina eta RyR1-en arteko lotura hobetzen dutela baieztatu da gure laborategian, gainera gihartzuntz distrofikoetan kaltzio-mailak normalizatzen dituzte eta mdx sagu distrofikoaren patologia zein gihar eskeletikoaren funtzioa hobetzen dute (Aldanondo, 2017).

Lan honetako **hipotesia** AHK molekulek kalstabina birmoldatzean, fenotipo muskularraz gain, Duchenne muskulu-distrofian kaltetuta dauden fenotipo kardiako eta kognitiboa ere hobetzen dituztela da. Beraz, ikerlan honetako **helburu nagusia** DMD gaixotasunaren patologia maila muskular, kardiako eta kognitiboan hobetuko duen AHK molekulen familiako hautagai bat lortzea da.

Hipotesi hau baieztatzeko ondorengo iturri zehatzak finkatu dira:

- 1- Hainbat AHK konposaturen toxikotasuna eta efikazia aztertuko da *sapje* zebra-arrainetan.
- 2- AHK2ak giharretako, bihotzeko eta nerbio-sistema zentraleko patologia berantiarretik babesteko duen eraginkortasuna aztertuko da mdx saguetan.

1. KAPITULUA

AHK konposatu^{en} toxikotasuna eta
eraginkortasuna sapje zebra-arrainetan

SARRERA

Duchenne muskulu-distrofia (DMD) haurtzaroan gehien diagnostikatzen den gaixotasun neuromuskularra da eta X kromosoman kodifikatuta dagoen distrofinaren geneko mutazioek eragiten dute. DMD duten mutikoek giharretako ahultasun eta endekapen progresiboa garatzen dituzte, batez beste 12 urterekin anbulazioa galtzen dute eta 20-30 urte bitarteko bizi-itxaropen murriztua dute arnasketa-aparatuko eta bihotzeko arazoak direla medio (Verma, Anziska, & Cracco, 2010).

Distrofinarik adierazten ez duen mdx sagua izan da animalia-eredurik erabiliena DMDren patogenesisia ikertzeko zein terapia berrien garapenerako. Dena dela, DMD duten mutikoen ezaugarri kliniko larriekin alderatuta mdx saguen fenotipoa arinagoa da; gainera, saguen bizi-itxaropena % 25 inguru mugatuta dago, gizakiena aldiz % 75 inguru (Banks & Chamberlain, 2008). Zebra-arrainetan (*Danio rerio*) *sapje* deiturikoa da DMDren eredu eta nukleotido bakarreko mutazioa du distrofinaren gene ortologoan, *sap*^{ta222a}; kasu honetan ez dago sexuari lotutako X kromosoman ugaztunetan bezala (Bassett et al., 2003) eta mutazio azpirakorra da. *Sapje* zebra-arrainetan ernalketa ondorengo 3-4 egunetara giharren desantolaketa azaleratzen da, mugimendu motorraren disfuntzio progresiboa dute eta ernaldu ondorengo 10-12 egunetara hiltzen dira (Waugh et al., 2014). Beraz, mdx saguekin alderatuta, gizakietan garatzen den DMD gaixotasuna hobeto adierazten dutela esan daiteke. Giharren desantolaketa ikusteko nahikoa da larben birrefringentzia begiratzea lente polarizatu eta lupa baten bidez (Widrick et al., 2016), eta heriotza goiztiarra izateak biziraupena ikertzeko esperimenduak errazten ditu.

DMDren beste animalia-eredu batzuekin alderatuta hainbat abantaila ditu: tamaina txikia, ondorengo asko sortzeko gaitasuna (errunaldi bakoitzean 100-200 enbrio), enbrioien gardentasuna eta mantenu-kostu baxuak (beste animalia-eredu batzuekin alderatuta 100-1000 aldiz merkeago) (Lipscomb, Piggott, Emmerson, & Winder, 2016; Raldúa & Piña, 2014). Gainera, eboluzio aldetik gizakiekin antzekotasuna dute eta, izaki sinpleagoak diren aldetik, euren genetika ongi deskribatuta dago (Long, Kostman, Fernandez, Burnett, & Huryn, 2019). Ezaugarri hauei esker, *sapje* zebra-arraina Duchenne muskulu-distrofiaren aurkako terapia zein sendagai berriak probatzeko animalia-eredu interesgarria da, tratamendu ezberdinen baheketa masiboak egitea ahalbidetzen du eta. Horregatik, azken urteetan gora egin du *sapje* zebra-arrainen

1. KAPITULUA

erabilerak ikerlan preklinikoetan DMDren aurkako hautagai terapeutikoak probatzeko (G. Kawahara et al., 2011; Genri Kawahara & Kunkel, 2013; Waugh et al., 2014).

Batez ere toxikotasun eta biziraupen probak egiteko erabiltzen dira, izan ere esperimentu hauek ugaztunetan egiteak askoz denbora gehiago eskatzen du; kostu ekonomiko altuagoa du eta, gainera, animalien ongizatea babesteko lege-muga gehiago ditu (Raldúa & Piña, 2014). Beraz, animaliekin esperimentazioan lan egitean oinarritzekoak diren 3 R arauak betetzeko (*replacement, reduction, refinement*) hainbat konpainia farmazeutikok dagoeneko zebra-arrainak erabiltzen dituzte sendagaiei lehen galbahea pasatzeko toxikotasun eta biziraupen probak eginez. Dena den, oinarritzeko esperimentu hauek egiteaz gain, *sapje* arrainetan beste parametro batzuk ere neurtu daitezke, besteak beste, Anders Arner-en taldeak neurketa mekanikoak egin ditu zebra-arrainen indarra neurtzeko. Giharren funtzioa eta estruktura lehen 5 egunetan garatzen da eta ildaskatutako giharren funtzionamendu mekanikoa neurtu daiteke orduan (Li, Andersson-Lendahl, Sejersen, & Arner, 2014).

Sapje zebra-arrainak enbrioi estadioan hiltzen direnez ezinbestekoa da progenitore heterozigotoak izatea kolonia mantentzeko. Horretarako arrainak genotipatzea lagungarria izan daiteke, ondoren zebra-arrain heterozigotoak hautatu eta hauek gurutzatzeko. Bestalde, sendagaien baheketa-entseguetan, helburua arrainen fenotipo distrofikoa berreskuratzea denean, beharrezkoa da ondoren arrainen genotipoa identifikatzea (Waugh et al., 2014). Sanger bidezko sekuentziazioa da zebra-arrainak genotipatzeko metodo erabiliena (Sztal, Sonntag, Hall, & Currie, 2012), baina teknika hau garestia eta astuna da, eta, gainera, laborategi guztietan ez dagoen ekipamendu berezia behar da. Horregatik, genotipatzeko teknika sinple bat izateak *sapje* zebra-arrainen erabilera erraztuko luke mundu mailako zenbait laborategi edo bioteknologia-konpainietan egiten ari diren entsegu preklinikoetan.

Lan honetan AHK konposatu ezberdinekin toxikotasun-probak eta efikazia-probak egin dira, besteak beste fenotipo distrofikoa hobetzen duten jakiteko baheketak eta indar-neurketa probak burutu dira. Gainera, *sapje* zebra-arrainak genotipatzeko metodo sinple, fidagarri eta merke bat optimizatu da.

MATERIAL ETA METODOAK

AHK molekulen diseinua eta sintesia

FKBP12/RyR1 konplexu tetramerikoaren kristal-egitura (*Protein Data Bank*-en 3J8H kodea) hartu da abiapuntutzat proteinen arteko interakzioa (PPI) edo elkarrekintza modulatzeko gai izan daitezkeen triazol-lotugaiak diseinatzeko. Lotugai modulatzailerak arrakastatsu batek interakzio gainazal kritikoaren azalerak elkartu behar ditu, *hot-spot*etako aminoazidoak lotuz. Elkarrekintzan garrantzitsuak diren hondar gako horiek konputazionalki identifikatu dira alaninak birtualki eskaneatuta; honek hondar bakoitzaren elkarrekintzen energia desberdintasunak erakusten ditu, indibidualki alaninara mutetzen direla simulatuz (Aizpurua et al., *bidalia*). Honela, egun patentatuta dauden (P201630670, 24/05/16) AHK konposatuak Aizpurua doktorearen taldean diseinatu eta sintetizatu dira (Donostia). Gainera, itu berdina duten ARMGO eta Servier konpainien S107 eta ARM210 molekulak ere sintetizatu dituzte artikulu eta patenteetako datuak erabiliz (WO2013156505A1).

Animaliak

Sapje zebra-arrainak (dmd/sap^{ta222a}) eskuratzeko mutazio honekiko heterozigotoak diren progenitoreak Tübingeneko Stock Collection-en lortu dira (Tübingen, Alemania). Sap^{ta222a} heterozigotoak Biobideko instalazioetako animaliategian (Donostia) eta Karolinska Institutet-eko Biologia Zelular eta Molekularreko Sailean (Estokolmo, Suedia) mantendu dira. Esperimentaziorako animaliak babesten dituen europar araudia errespetatu da (2010/63/EU), aurrez beste lan batzuetan deskribatu den bezala (Alzualde et al., 2018) eta komite etikoek onartutako prozedurak erabili dira. Sap^{ta222a} heterozigotoak gurutzatzean zebra-arrain kontrolak, Sap^{ta222a} heterozigotoak eta Sap^{ta222a} homozigotoak (*sapje*) lortu dira. Ondoren azalduko diren esperimenduetan soilik 6 dpf (*days post fertilization*: ernaldu ondorengo egunak) arteko enbrioak erabili dira.

Fenotipoa bereizteko birrefringentzia analisia

Sapje zebra-arrainen fenotipoa 3-4 dpf-ra bereizi daiteke, enbrioietan birrefringentzia patroia irregular bat ikusten baita (Widrick et al., 2016). Zebra-arrain enbrioak argi polarizatu batekin ikustean muskulu eskeletikoak argi-patroi bat igortzen du, eta birrefringentzia bidez giharren distribuzio anatomikoa ikusi daiteke honela. *Wild-type*

1. KAPITULUA

enbrioiek patroi ordenatua dute eta *sapje* enbrioiek, aldiz, patroi irregular eta murriztua dute. Birrefringentzia patroia aztertzeko enbrioiak anesthesiatu behar dira lehendabizi % 0,2 trikaina erabiliz. Ondoren, enbrioiak zeharka kokatzen dira bi lente polarizatuen artean, eta, polarizatutako lenteetako bat mugituz lupa bidez birrefringentzia maximoko puntua ikustea lortuko da. Giharretan afekziorik ez duten enbrioietan ondo antolatutako somitoak edo giharren segmentuak erraz bereizten dira enbrioioi distrofikoek dituzten patroioi desantolatu eta traketsetatik (birrefringentzia anormala).

Toxikotasuna

AHK konposatuen familiako AHK1, AHK2 eta AHK3ren toxikotasuna neurtu da S107 eta ARM210 Rycals-ekin batera superbibentzia kurbak eginez. Horretarako 3 dpf-ko enbrioio kontrolak erabili dira eta 6 dpf-ra bizirauteko izan duten gaitasuna neurtu da, konposatuen hainbat kontzentraziorekin tratatu eta gero (0,05 mM, 0,2 mM, 0,5 mM eta 1 mM), hau da, baldintza jakin bakoitzean hildako enbrioioen ehunekoa aztertu da. Esperimentu hauek Anders Arner-en laborategian egin dira Karolinska Institutet-en (Stockholm, Suedia).

Genotipatzea

DNA erauzketa

Zebra-arrain enbrioioak osorik hartu eta lisi alkalinoa erabilita protokolo azkar baten bidez erauzi da DNA (Meeker, Hutchinson, Ho, & Trede, 2007). Enbrioioak lisatzeko hauek hodi batzuetan sartu, 20 μ l NaOH 50 mM gehitu eta 10 minutuz 95 °C-ra berotu dira. Berehala, laginak 4 °C-ra hoztu eta pH 8-ra dagoen 2 μ l Tris-HCl 1M-ekin neutralizatu dira. DNA kontzentrazioa NanoDrop™ 1000 espektrofotometroa erabilita neurtu da.

Primerren diseinua

HRM (*high resolution melting*) teknikarako zein Sanger bidez sekuentziatzeko PCR produktua lortzeko primer bikote bat diseinatu da, *forward* eta *reverse*-a (HRM_For eta HRM_rev 1. taulan), non *sapje* nukleotido bakarreko mutazioa anplifikatutako PCR

produktuaren erdian egongo den. Diseinurako Primer Express softwarea erabili da (Thermo Fisher).

Primer lehiakorren PCRrako (pcPCR: *primer competition PCR*) 1. taulan ikusgai dagoen primer hirukotea diseinatu da: *forward* primer komuna (pcPCR_For), *wild-type* aleloarentzat *reverse* primerra (pcPCR_WT_Rev) eta *sapje* alelo mutantearentzat *reverse* primerra (pcPCR_Mut_Rev). Mdx saguak genotipatzeko aurrez deskribatutako pcPCR teknikan oinarrituta diseinatu dira primer hauek (Jin-Hong Shin, Chady H. Hakim & Duan, 2012). Honela, G eta C nukleotidoz osatutako sekuentzia ez-espezifiko laburrak (taulan gorritz adierazi dira) gehitu zaizkie pcPCR_For eta pcPCR_Mut_Rev primerrei eta pcPCR_WT_Rev primerrari isats sintetiko ez espezifiko bat gehitu zaio (hau ere gorritz markatuta). Honela, PCR produktuak tamainaren arabera bereizi ahal izango dira (*wild-type* aleloaren PCR produktua 107 base-parekoa izango da eta *sapje* aleloarena 89 bp-koa).

Primerrak	Primerren sekuentzia (5'→3')	PCR produktuen tamaina (bp)
HRM/Sanger		
HRM_For	TTCATTTGCAATGGATGCTCAA	166
HRM_Rev	AATAGTAAAACAGCCAGCTGAACCA	
pcPCR		
pcPCR_For	GCGCG TTCATTTGCAATGGATGCTCAA	
pcPCR_WT_Rev	GATACGCTGCTTTAATGCCTTTA ACTCGAGTGAAGCCACGTTCTTT	107
pcPCR_Mut_Rev	CGGCC ACTCGAGTGAAGCCACGTTCTTA	89

1. TAULA. PCR primerrak eta esperotako PCR produktuak. Letra lodiz idatzita dauden hizkiek *sapje* mutazioaren tokiko nukleotidoak adierazten dituzte, alelo bakoitzarentzat espezifikoak diren nukleotidoak. Gorritz markatutako nukleotidoak, aldiz, zebra-arrainarekin batuko ez diren isats inespezifikoak dira, pcPCR-aren ondoren PCR produktua tamainaren arabera sailkatuko dutenak.

PCR konbentzionala HRM eta Sanger analisirako

PCRa (*polimerase chain reaction*) egiteko Precision Melt Supermix (Bio-Rad) erreaktiboa erabili da. Supermix honek dNTP-ak, polimerasa entzima, magnesio eta kaltzio kontzentrazio aproposa eta DMSOa ditu, PCRa egiteko beharrezko osagaiak alegia, EvaGreen fluorokromoaz gain. Soilik HRM_For eta HRM_Rev primerrak 300 nM kontzentrazioan eta DNA 1 ng/μl gehitu behar zaizkie. PCRa ondorengo baldintzetan

1. KAPITULUA

egin da: hasierako desnaturalizazio fasea 95 °C-ra 3 minutuz, eta, amplifikaziorako 34 ziklo egin dira, 10 segundo 95 °C-ra eta minutu bat 60 °C-ra.

HRM analisietarako 3 erreplika egin dira CFX384 Touch PCR ekipoa (Bio-Rad) eta temperatura gradientea 65etik 95 °C-ra egin da 5 segundoro 0,1 °C igoz. Genotipoak bereizteko normalizatutako *melt* edo urtze grafikoak aztertu dira Precision Melt Analysis softwarea erabilita (Bio-Rad), programa honek urtze-puntu ezberdina duten PCR produktuak desberdintzen ditu kluster ezberdinetan.

Sanger sekuentziaziorako PCR produktuak ExoSAP-ekin (Applied Biosystems) purifikatu dira. Horretarako 5 µl PCR produkturi 2 µl ExoSAP gehitu zaizkio eta termozikladorean ondorengo programa jarri da: 15 minutuz 37 °C, 15 minutuz 80 °C eta gero 4 °C-ra hoztu dira. Purifikatu eta gero, 16 kapilarretako ABI 3130Xi plataforma erabiliz sekuentziatu dira (Applied Biosystems), fabrikatzailearen protokoloa jarraituz Biodonostiako Genomikako plataforman.

Primer lehiakor bidezko PCRa

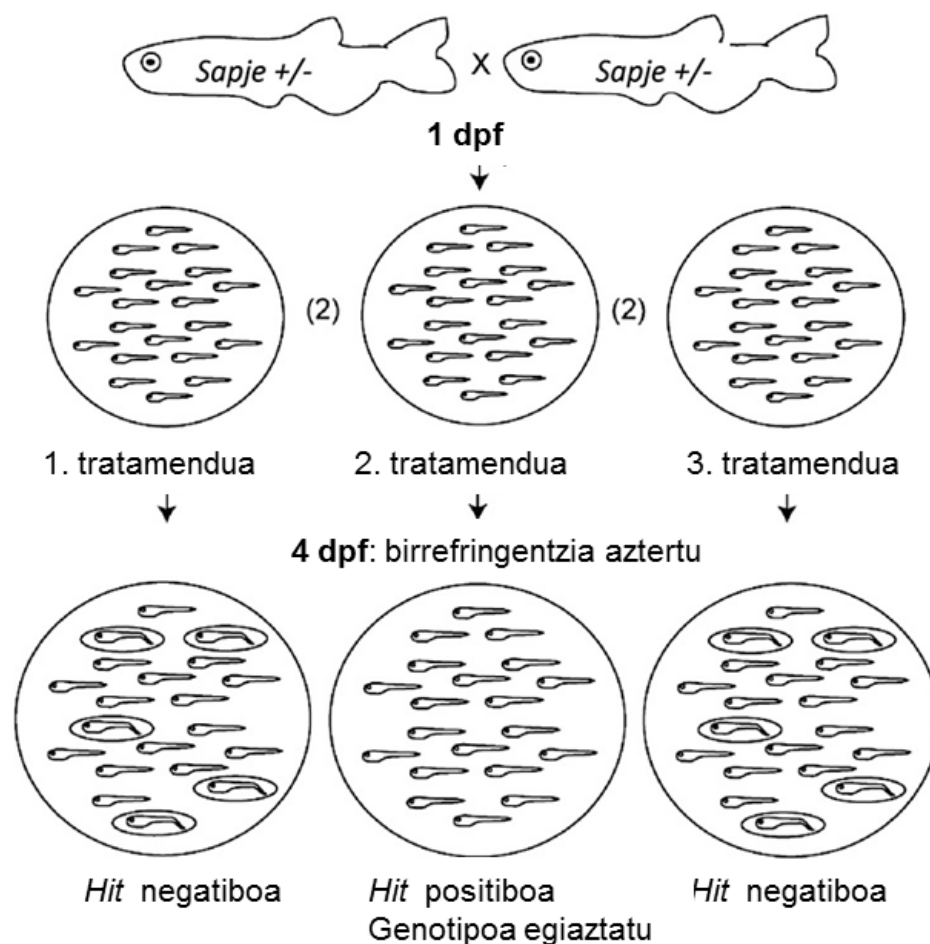
pcPCR-a deiturikoa egiteko Precision Melt Supermix-a erabili da (Bio-Rad), primer bakoitzetik 200 nM gehitu zaizkio (pcPCR_For, pcPCR_WT_Rev eta pcPCR_Mut_Rev) eta azkenik DNA gehitu zaio, gutxi gorabehera 10 ng/µl. pcPCR-a ondorengo baldintzetan egin da: hasierako desnaturalizazio fasea 95 °C-ra 3 minutuz, eta, amplifikaziorako 34 ziklo, 10 segundo 95 °C-ra eta minutu bat 65 °C-ra.

Espero diren PCR produktuen tamainak 1. taulan daude adierazita. PCR produktu hauek bereizteko % 3ko agarosa-gel bat erabili daiteke elektroforesi bidez tamainaren arabera desberdintzeko. Beste aukera bat HRM bidez bereiztea da aurreko atalean deskribatu bezala; 2 PCR produktuek urtze-tenperatura desberdina dute, eta beraz, 3 genotipoak 3 kluster desberdinetan bereiziko ditu HRMak.

AHK konposatuen baheketa

AHK konposatuek *sapje* arrainen fenotipoa aldatzen duten edo ez ikusteko aurrez potentzial terapeutikoa duten tratamenduen *screening* edo baheketa egiteko deskribatu izan den protokolo bat jarraitu da (Vaugh et al., 2014). Progenitore heterozigotoak gurutzatu eta hurrengo egunean, 1 dpf, errunaldi horretan lortutako itxura oneko enbrioak hautatu dira esperimenturako. Enbrioak P6 plaka batean hogeinaka jarri dira

eta putzu bakoitzean baldintza bat jarri da, baldintzako bi putzuko erreplikekin. Ondorengo baldintzak aztertu dira esperimendu honetan: ND (*non-drug*, tratamendurik gabekoa), AHK1 1 μM eta AHK2 1 μM . Medioa E3, Hepes eta % 0,5 DMSOarekin prestatu da eta egunero freskatu zaie. 4 dpf-ra zebra-arrain enbrioien fenotipoa identifikatu da birrefringentzia analisi bidez. *Sapje* mutazioa azpirakorra denez, Mendelen legearen arabera, tratatu gabeko 20 enbrioietatik 5ek (% 25ak) birrefringentzia anormala izan beharko lukete. Honela, konposatu ezberdinak probatzean fenotipo distrofikoa % 10ak baino gutxiagok badu *hit* positibo bezala hartuko da, hau da, konposatuek fenotipoa modulatzeko gaitasuna dutela ulertuko da (1. IRUDIA). Ondoren, beharrezkoa da *hit* positibo hauek genotipo bidez egiaztatzea. Tratamendua eta birrefringentzia bidezko fenotipatzea Biobideko instalakuntzetan egin da (Donostia) eta genotipatzea Biodonostian.



1. IRUDIA. Konposatu ezberdinen baheketa egiteko protokoloa. (Waugh et al., 2014).

Indar-neurketa

Zebra-arrain enbrioiak 3 dpf-ra hasi dute tratamendua, AHK1, 2 eta 3rekin 0,1 μM , 1 μM eta 5 μM -eko kontzentrazioa, eta 5 dpf-ra indar-neurketak egin zaizkie aurrez deskribatutako protokolo bat erabiliz (Li et al., 2014). Esperimentu hauek Anders Arner doktorearen laborategian egin dituzte Karolinska Institutet-en (Stockholm, Suedia) eta ondoren Biodonostian genotipatu dira.

Arner-en taldeak eurek prestatutako indar-neurgailu bat du zebra-arrain enbrioiekin erabiltzeko optimizatuta. Honela, behin enbrioiak birrefringentzia bidez fenotipatu ostean, aluminiozko klipen bidez indar transduktore batera eta finkatuta dagoen kako edo amu batera lotu dira, bi alboetan platinozko elektrodoak dituztela. Bainua 22 °C-ra mantendu da perfusio bidez azido morfolinopropanosulfonikoarekin (MOPS) tanponatutako soluzioa erabilia (pH 7,4). Soluzioaren konposizioa ondorengoa da mM-tan: 118 NaCl, 5 KCl, 1,2 MgCl₂, 1,2 Na₂HPO₄, 24 MOPS, 10 glukosa eta 1,6 CaCl₂. Enbrioia muntatzerakoan hasieran tenkatu gabeko luzera lasai batean ipini da. Ondoren, *twitch* edo pultsu bakarreko estimulazioak egin zaizkio 0,5 ms eta potentzial-diferentzia maximoa erabiliz 2 minutuko interbalotan. Luzera pixkanaka handituz joan da uzkurte estimuluen artean, hasierako tenkatu gabeko luzeratik (Ls) indar aktibo maximoa lortzen den luzeraraino. Luzera bakoitzean indar aktiboa neurtu da. Luzera-indar erlazio hau enbrioio bakoitzarekin zehaztu da muntaketa bakoitzaren luzera optimoa identifikatzeko (Lopt). Behin indarra neurtuta, enbrioiak fijatu dira paraformaldehidoa erabiliz eta % 70 etanolean gorde dira ondoren Biodonostian genotipatzeko.

Estatistika

Graphpad Prism 6 erabili da estatistikako analisietarako. *Outlier* balioak kentzeko Graphpad-en *Outliers Calculator* onlineko aplikazioa erabili da eta esangura-maila $\alpha = 0,05$ -ean ezarri da (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Ondoren, aldagaien distribuzioa aztertu da D'Agostino eta Pearson-en normalitate testa erabilia eta honela, distribuzio parametrikoa duten aldagaietan t test ez-binakatuarekin alderatu dira emaitzak, eta distribuzio ez-parametrikoa dutenekin Mann-Whitney testa erabili da ezberdintasunak estatistikoki esanguratsuak diren edo ez jakiteko.

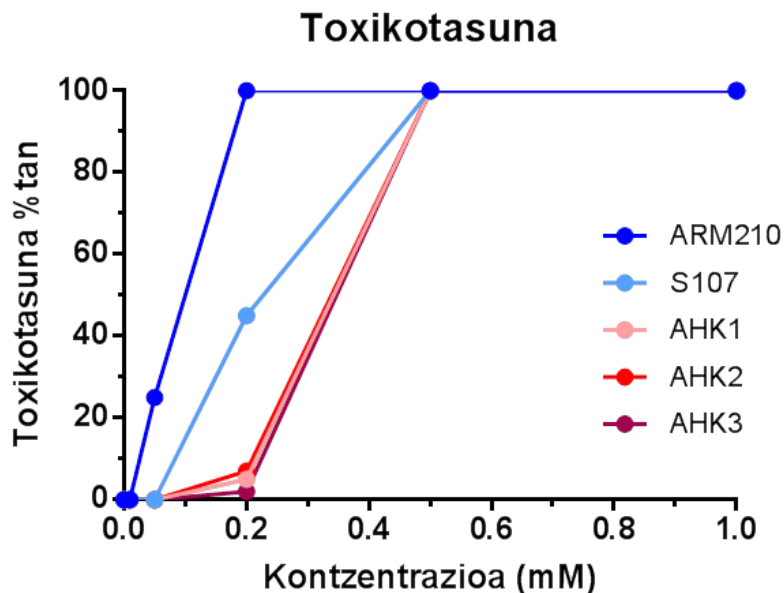
Berreskuratze-mailaren ehunekoa ondorengo formula erabiliz kalkulatu da (Gillis & Carlson, 2008):

$$\text{Berreskuratze mailaren ehunekoa} = \frac{\text{mdx tratatuak} - \text{mdx tratatu gabeak}}{\text{kontrolak} - \text{mdx tratatu gabeak}} \times 100$$

EMAITZAK

Toxikotasuna

Lehenik eta behin AHK konposatuen toxikotasuna (1, 2 eta 3) aztertu da *wild-type* zebra-arrainen enbrioietan eta riandoina-hartzaileen egonkortzaileekin (S107 eta ARM210) konparatu da, antzeko akzio-mekanismoa dutelako. Enbrioiak kontzentrazio desberdinekin tratatu dira (50 μM , 200 μM , 500 μM eta 1000 μM) eta heriotza tasa neurtu da hiru egun beranduago. 2. irudian ikusi daitekeen bezala, AHK konposatuek S107 eta ARM210ek baino toxikotasun gutxiago dute. Honela ARM210aren gutxi gorabeherako LD50a (populazioaren % 50arentzat letala den dosia) 80 μM da eta S107rena 200 μM . AHK1, 2 eta 3ren gutxi gorabeherako LD50a, ordea, 300 μM da, beraz AHK molekulek segurtasun-profil hobea dute S107rekin eta, batez ere, ARM210ekin konparatuta.



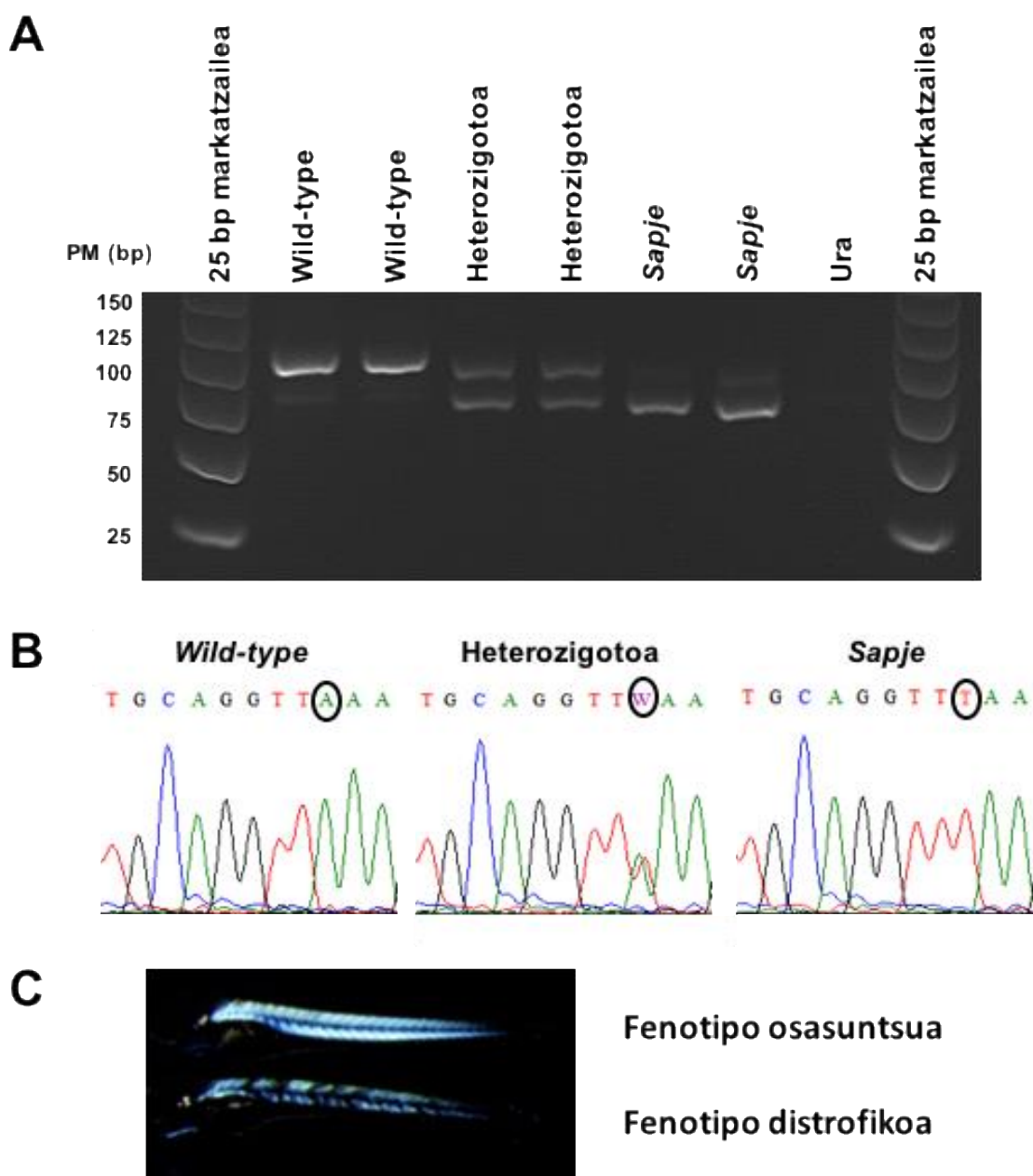
2. IRUDIA. Toxikotasun kurbak 6 dpf-ra zebra-arrain enbrioio kontrolatan.

Sapje zebra-arrainen genotipatzea

Zebra-arrain distrofikoa erabiltzeko planteatu diren esperimientuetan beharrezkoa da enbrioak genotipatzeko teknika erraz eta azkar bat. Lagin askorekin lan egingo denez *sapje* zebra-arrainak genotipatzeko sistema hobetzea erabaki da, izan ere, orain arte Sanger bidezko sekuentziazioa erabiltzea izan da ohikoena. Horretarako 6 dpf-ko zebra-arrainak erabili dira. Lagin guztietan nahikoa DNA eraztea lortu da ondoren PCR bidez amplifikatzeko, batez beste 200-400 ng/ μ l 20 μ l-tan. Lehendabizi, HRM teknikaren bidez zuzenean genotipatzea izan da helburua. HRM, edo bereizmen altuko urtzea, PCR ondorengo metodo analitiko bat da eta azido nukleikoen sekuentzietan aldaketak identifikatzeko balio du. Teknika honen bidez fluoreszentzia intentsitatean aldaketak detektatu daitezke PCR produktuak harizpi bikoitza izatetik harizpi bakarra izatera pasatzen direnean; izan ere, PCR produktuetan fluoreszentzia partikulak txertatuko dira amplifikazio fasean, eta HRM fasean, tenperatura igotzen doan heinean, DNAREN bi harizpiak askatzen joango dira, eta nukleotido sekuentziaren arabera tenperatura gradientearen puntu desberdinean disoziatuko dira. Beraz, teknika honen bidez, disoziazio-kurbak begiratzuz, PCR produktuetan dauden bariazio txikiak detektatu daitezke. Bereziki erabilgarria da lagin asko analizatu behar direnean eta ohikoa da bere erabilera nukleotido bakarreko mutazioak diskriminatzeke 300 bp arteko PCR produktuetan (Anasagasti et al., 2013), besteak beste aurrez ere erabili izan da C/T aldaketa duten mdx saguak genotipatzeko (Trebbin & Hoey, 2009).

Horrenbestez, metodo hau erabili nahi izan da *sapje* zebra-arraina genotipatzeko. *Wild-type* eta *sapje*ren artean urtze-desberdintasuna maximizatzeko, primer bikote bat diseinatu da 166 pb-ko PCR produktu bat lortzeko (1.TAULA). Jarraian PCR-HRM protokoloa jarraitu da, baina soilik heterozigotoak beste bi taldeetatik bereizteko, *wild-type* eta *sapje*, balio izan du. Nolabait emaitza hau espero zitekeen, izan ere *sapje* zebra-arrainen mutazioa T/A aldaketa bakarra da, eta nukleotido hauen arteko aldaketa bereiztea oso zaila da HRM teknika bidez. Biek ala biek lotura bikoitzak osatzen dituzte eta urtze-kurbetan aldaketa oso txikiak eragiten ditu nukleotido bat edo beste izateak (< 0,2 °C). Mdx saguetan C/T mutazioa HRM bidez detektatu daiteke urtze-kurbetan tenperatura aldaketa handiagoa baitago (~ 0,8 °C). T/A baseen aldaketak HRM bidez detektatu nahi direnean ohikoa den bezala, laginak *wild-type* arrainen DNAREKIN 1:1 diluitzean, *sapje* eta *wild-type* genotipoak bereizi ahal izan dira. Dena dela, azken pausu honek kontaminaziorako arriskua areagotzen du eta teknikaren kostu zein denbora luzatzen du.

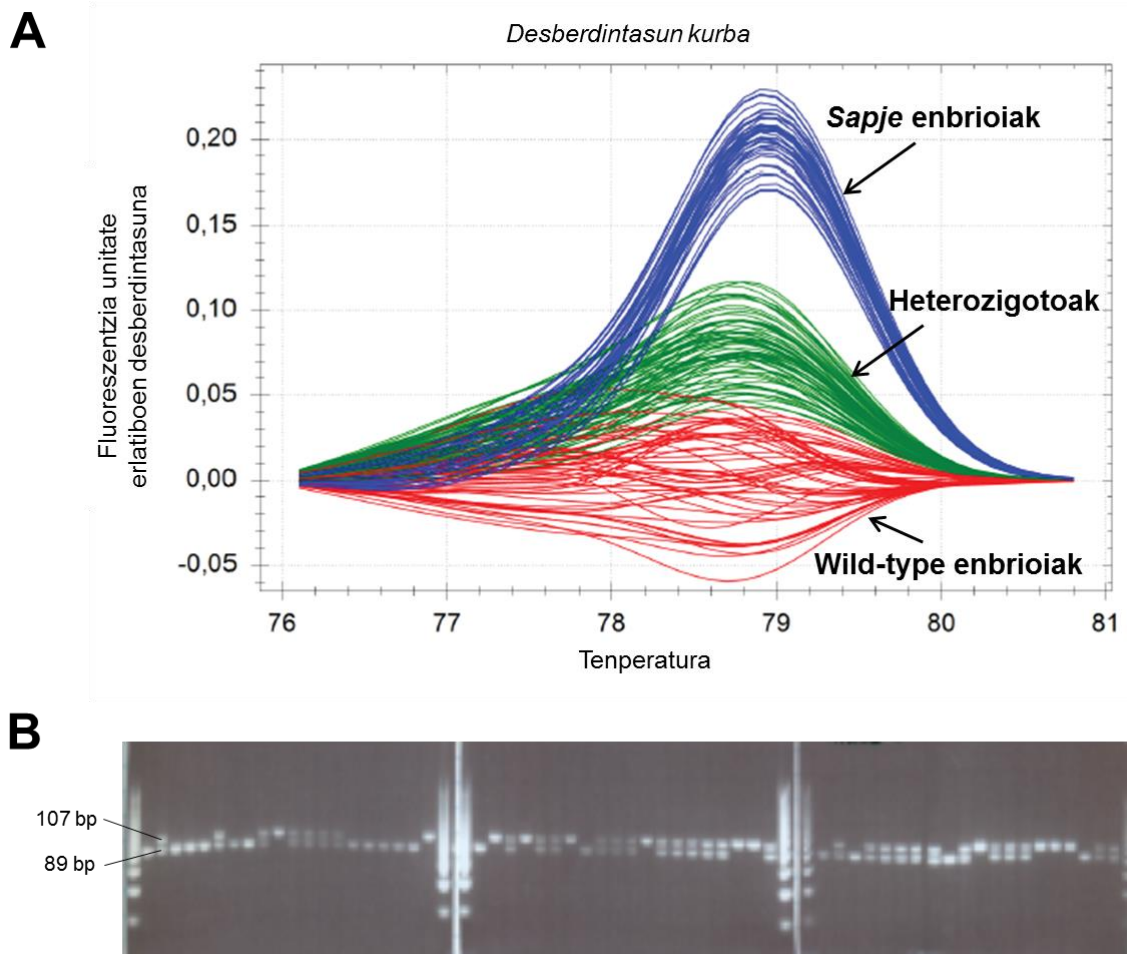
Honegatik guztiagatik, bestelako estrategia bat erabiltzea erabaki da primer lehiakorretan oinarritutako PCRA erabiliz (pcPCR), mdx saguak genotipatzeko erabiltzen dena bezala (Jin-Hong Shin, Chady H. Hakim & Duan, 2012). Laborategian diseinatu den primer hirukotea erabiliz esperotako tamainako PCR produktuak amplifikatu ditu, eta ez da bestelako bandarik ikusi agarosa-gelean egindako elektroforesi bidez (3. IRUDIA, A). Sanger sekuentziazioarekin genotipoa egiaztatu da (3. IRUDIA, B). Eta, gainera, DNA atera aurretik birrefringentzia bidez ikusitako fenotipoarekin bat dator genotipoa (3. IRUDIA, C).



1. KAPITULUA

3. IRUDIA. (A) pcPCR produktuaren bandak %3ko agarosa-gelean bereizita: goiko banda *wild-type* enbrioiarena da, beheko banda *sapje*arena eta bi bandak baditu, bi aleloak ditu eta heterozigotoa da. (B) Hiru genotipoen sekuentziak Sanger bidez. (C) Zebra-arrain osasuntsu eta distrofikoaren argazkia, non fenotipoa birrefringentziaren bitartez identifikatu daiteken.

Behin metodoaren espezifikotasuna baieztatuta, HRM analisi bidez pcPCR-ko produktuak bereiztea posible ote den ikusi nahi izan da, honek lagin kopuru handien aldibereko genotipatzea erraztuko luke eta. Horretarako "AHK konposatuen baheketa" atalean erabili diren 60 zebra-arrain erabili dira, horietatik 17k zuten fenotipo distrofikoa birrefringentzia bidez. Lagin hauek pcPCR-aren ostean HRM bidez aztertu dira (4. IRUDIA, A) hiruna aletan eginda. HRM-a egin ondoren disoziazio-kurbak begiratu eta 3 klusterretan bereizi dira laginak, *wild-type*, heterozigotoak eta *sapje* mutanteak hain zuzen. Kasu guztietan *wild-type*, heterozigoto eta mutanteen arteko desberdintasunak argiak izan dira. Gainera, pcPCR produktu hauek % 3ko agarosa-gelean elektroforesi bidez banandu ondoren, banden tamaina eta kopuruarekin identifikatu diren genotipoak bat datoz HRM bidez lortutakoekin kasuen % 100ean (4. IRUDIA, B). Eta, noski, emaitza hauek ere bat datoz birrefringentzia bidez identifikatutako fenotipoarekin.



4. IRUDIA. pcPCR produktuen identifikazioa. **(A)** HRMaren bidez 60 lagin hiru klusterretan banatu dira: *wild-type*, heterozigotoak eta *sapjeak*. **(B)** 60 laginen pcPCR produktuak % 3 agarosa-gelean bereizita.

Azpimarratzekoa da genotipatzeko egin den pcPCR-ak paraformaldehidoarekin fijatutako eta ondoren etanolean gordetako enbrioietan zein izoztutakoetan funtzionatu duela, hots, zebra-arrainen DNAaren kalitatea okerragoa denean ere teknika genotipatzeko baliagarria da.

AHK konposatuen baheketa

Zebra-arrainak enbrioi estadiotan genotipatzeko metodoa optimizatu ondoren, AHK konposatuen eraginkortasuna aztertu nahi izan da *sapje* zebra-arrainen fenotipo distrofikoa erreskatatzen, aurrez deskribatuta dagoen protokolo bat erabiliz (Waugh et al., 2014). Progenitore heterozigotoak gurutzatuta eskuratu diren 1 dpf-ko zebra-arrain enbrioiak 3 egunez jarraian tratatu eta gero, 4 dpf-ra, fenotipoa aztertu da

1. KAPITULUA

birrefringentzia bidez. Lan honetan bikote heterozigoto baten errunaldia erabili da putzuko. Fenotipoa begiztatu ondoren, tratatutako putzuek fenotipo distrofikodun enbrioi gutxiago dituztela ikusi da tratamendurik gabeko putzuekin alderatuta (5. IRUDIA, A). Zehazki, baldintzako guztira 40 enbrioi izanik 6 eta 8 distrofiko identifikatu dira AHK1 eta AHK2arekin tratatutako putzuetan, hurrenez hurren; aldiz, 17 enbrioi distrofiko ageri dira tratatu gabeko putzuetan. Hori dela eta, lagin guztiak genotipatzea erabaki da, aurreko atalean deskribatutako pcPCR bidez. Horrela, kasu guztietan fenotipoak genotipoarekin % 100ean bat egiten duela ebatzi da, hots, ez da *sapje* genotipodun zebra-arrain ez distrofikorik atzeman (5. IRUDIA, B). Beraz, AHK1 eta AHK2 konposatuak fenotipo distrofikoa erreskatatzeko gai ez direla ondorioztatu da, 1 μ M-ko kontzentrazioan behinik behin.

A

n	FENOTIPOA					
	ND		AHK1 1uM		AHK2 1uM	
	1. putzua	2. putzua	3. putzua	4. putzua	5. putzua	6. putzua
1	D	H	D	D	D	D
2	H	H	D	H	H	H
3	D	H	H	H	D	H
4	D	H	H	H	H	H
5	D	D	H	H	H	D
6	H	D	D	H	H	H
7	D	D	H	H	H	D
8	D	D	H	D	H	H
9	H	D	H	H	D	H
10	H	H	H	H	H	H
11	H	H	H	H	H	H
12	H	H	H	H	H	D
13	H	H	H	H	H	H
14	H	H	H	H	H	H
15	D	H	H	H	H	H
16	D	H	H	H	H	H
17	D	H	H	H	H	H
18	D	H	H	H	D	H
19	D	H	H	H	H	H
20	H	D	D	H	H	H

Distrofikoak	11	6	4	2	4	4
Hit positiboak	Ez	Ez	Ez	Bai	Ez	Ez

B

n	GENOTIPOA					
	ND		AHK1 1uM		AHK2 1uM	
	1. putzua	2. putzua	3. putzua	4. putzua	5. putzua	6. putzua
1	S	W	S	S	S	S
2	H	W	S	W	H	W
3	S	H	H	H	S	H
4	S	H	W	W	H	H
5	S	S	W	H	H	S
6	H	S	S	H	H	H
7	S	S	H	W	H	S
8	S	S	W	S	H	W
9	H	S	H	H	S	W
10	W	W	W	H	H	W
11	H	W	H	H	W	H
12	H	W	W	W	H	S
13	H	H	H	H	H	H
14	H	H	H	H	H	H
15	S	H	W	H	W	H
16	S	H	W	H	W	H
17	S	H	W	H	W	H
18	S	H	H	W	S	W
19	S	H	H	W	H	W
20	W	S	S	H	H	H

Wild-type	2	5	8	6	4	6	Guztira	31	%-tan	26
Heterozigotoak	7	9	8	12	12	10		58		48
Sapje	11	6	4	2	4	4		31		26

5. IRUDIA. Aztertutako enbrioi fenotipoa eta genotipoa. **(A)** Enbrioi bakoitzaren fenotipoa zehaztu da birrefringentzia bidez ikusitako patrioiaren arabera: H (healthy edo osasuntsua) eta D (distrofikoa); eta, **(B)** genotipoa identifikatu da pcPCR bidez: S (*sapje*), W (*wild-type*) eta H (heterozigotoa).

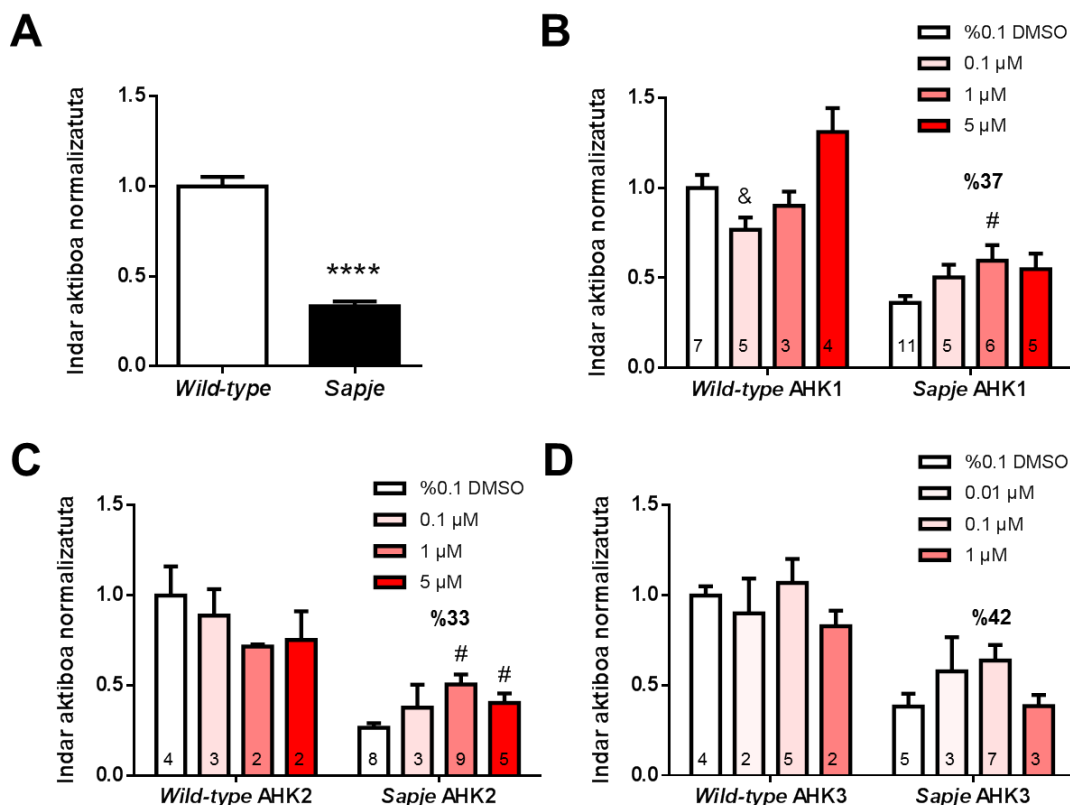
Bestalde, enbrioi guztiak aztertzean % 26ak *sapje* genotipoa duela ebatzi da, Mendelen legearen arabera % 25ek izan beharko luke genotipo hau eta bat dator lortu den ehunekoarekin. Gainera, putzu guztietan *sapje*ren bat dagonez hautatutako progenitore guztiak heterozigotoak direla baieztatu da. Dena den, aldakortasun handia ikusi da putzu batetik bestera, *sapje* genotipoko zebra-arrainak 2tik 11ra zenbatu baitira 20 enbrioi putzuetan. *Hit* positiboak hautatzearen protokoloa erdipurdikoa dela ondorioztatu daiteke, oso zaila baita Mendelen legea betetzea 20 enbrioi dituzten putzu bakoitzean eta

beharrezkoa da putzu guztiak egiaztatzea genotipoa aztertuta, eta ez soilik *hit* positibo bezala identifikatzen direnak. Aldakortasun altu honek asko zailtzen du Waugh-ek deskribatutako (2014) protokoloaren bitartez farmakoen baheketa masiboak egitea potentzial terapeutikoa duten *hit* positiboak detektatzeko, horregatik AHK konposatuak testatzeko protokolo honekin ez jarraitzea erabaki da.

Indar-neurketak

Nahiz eta aurreko atalean lortutako emaitzek 1 μM AHK1 eta AHK2 tratamenduak *sapje* zebra-arrain enbrioien fenotipo distrofikoa aldatzen ez dutela erakutsi duten, enbrioien uzkurtze-indarra neurtzen duen teknika sentikorrago bat probatzea erabaki da Anders Arner doktorearen taldearekin kolaborazioan (Estokolmo, Suedia). Teknika honen abantaila nagusia baheketa fenotipikoa baino sentikorragoa eta kuantitatiboagoa dela da. Hala ere, teknika konplexua denez ezin da farmakoen baheketa edo *screening* masiborako erabili. Horregatik, soilik AHK1, AHK2 eta AHK3 probatzea erabaki da dosi ezberdinetan (0,1 μM , 1 μM eta 5 μM). Garraio moduan % 0,1 DMSO erabili da. Enbrioiak fenotipatu eta tratatu ondoren *twitch* indarra neurtu da animaliak luzera optimora tenkatuta daudenean (Lopt). Emaitzak tratamendurik izan ez duten *wild-typen* indarrarekin normalizatu dira. *Sapje* zebra-arrainek *wild-type* baino % 67 indar gutxiago dutela ikusi da (6. IRUDIA, A: $p < 0,0001$). Tratatutako *wild-type* enbrioietan AHK konposatuek ez dute arrainen indarra hobetu, ez da aldaketa esanguratsurik ikusi tratamenduen ondoren. *Sapje* arrainek indarra bikoiztu dute zenbait kasutan AHK tratamenduaren ondorioz. Besteak beste, AHK1arekin 0,1 μM kontzentrazioa berreskuratze-maila % 22koa da, 1 μM -era % 37koa eta 5 μM -era % 29ko, baina soilik 1 μM -ra ikusitako aldaketak izan dira estatistikoki esanguratsuak. Enbrio distrofitikoak AHK2arekin tratatzean ere indarra hobetu da kontzentrazio guztietan, 0,1 μM -era berreskuratze-maila % 15koa izan da, 1 μM -era % 33koa eta 5 μM -era % 19koa; azken bietan hobekuntza estatistikoki esanguratsua izan da. AHK3rekin 0,1 μM -era indarra % 42 berreskuratzen dutela ikusi da, eta ondoren efektua galtzen duela dirudenez 0,01 μM -eko kontzentrazio baxuagoarekin ere tratatu dira % 32ko berreskuratzen-mailarekin; dena den, aldaketa hauek ez dira estatistikoki adierazgarriak laginen arteko aldakortasun altua dela eta. Hala ere AHK3ak potentzia terapeutiko handiagoa izan dezakeela dirudi, kontzentrazio baxuagoan ikusi baita eraginkortasun handiena.

1. KAPITULUA



6. IRUDIA. Indar aktiboa normalizatuta. (A) Esperimentu guztietan garraioarekin tratatutako *wild-type* enbrioiaik garraioarekin tratatutako *sapje*ekin alderatu dira. (B) AHK1arekin tratatutako enbrioien datuak. (C) AHK2arekin tratatutako enbrioien datuak. (D) AHK3arekin tratatutako enbrioien datuak. Datuak batezbestekoa \pm SEM gisa irudikatu dira eta berreskuratze-maila adierazi da hobekuntza maximoak izan dituzten *sapje* arrainetan; $n = 2-11$, barretan adierazi da; **** vs *wild-type* $p < 0.0001$, & vs *wild-type* %0.1 DMSO $p < 0.05$, # vs *sapje* %0.1 DMSO $p < 0.05$ (Mann-Whitney testa eta t test ez-binakatua).

Honenbestez, hiru konposatuak AHK1, AHK2 eta AHK3 uzkuratze-indar aktiboa hobetzen eraginkorrak direla ebatzi da *sapje* zebra-arrainetan, eta lortutako hobekuntza dosiaren baitakoa izan da, nahiz eta optimoaz gaindiko kontzentrazioetan efektua diluitzen den. AHK konposatuen tratamenduari esker galdutako uzkuratze-indarra berreskuratzen dute partzialki, hiru konposatuekin antzeko berreskuratze-mailak lortuz (% 33-42). Aurrez toxikotasuna aztertzean lortutako emaitzak kontuan izanik, konposatu hauen gutxi gorabeherako indize terapeutikoa (LD50/EC50: populazioaren % 50arentzat letala den dosia zati populazioaren % 50arentzat eraginkorra den dosia) 3.000-30.000 artekoa da eta honek adierazten du AHK konposatuak hagitz seguruak direla eta leiho terapeutiko zabala dutela.

EZTABAIDA

Sapje arrain-zebraren erabilera gorantz doa DMDren animalia-eredu gisa, batetik, mekanismo patogenikoak ikertzeko eta, bestetik, potentzial terapeutikoa izan dezaketen konposatu berrien baheketa masiboak egiteko edo hautagai diren farmakoei lehen galbahea pasatzeko (G. Kawahara et al., 2011; Genri Kawahara & Kunkel, 2013; Waugh et al., 2014). Lan honetan AHK konposatuen toxikotasuna eta eraginkortasuna neurtu nahi izan da animalia-eredu honetan.

AHK konposatuen toxikotasuna neurtu da lehendabizi. Horretarako *wild-type* zebra-arrainen enbrioiak erabili dira eta hainbat AHK konposaturen biziraupen-kurbak Rycals familiako konposatuak diren S107 eta ARM210-ekin alderatu dira. Kurba hauek aztertzerakoan ondorioztatu daiteke probatu diren AHK konposatu guztiak S107-k, eta, batez ere, ARM210-ek baino toxikotasun gutxiago dutela zebra-arrainetan. ARMGO konpainiak, <http://www.armgo.com>, S107 baztertu behar izan zuen entsegu klinikoetan eta orain ARM210 da familia honetako molekuletatik DMDrako hautagai nagusia (Capogrosso et al., 2018). Horregatik, AHK konposatuak ARM210 baino toxikotasun gutxiago izatea abantaila garrantzitsua izan daiteke molekula hauek Duchenne muskulu-distrofriaren aurkako farmako gisa garatzeko.

Ondoren, AHK konposatuen eraginkortasuna neurtzeko esperimuntetarako erabilgarria den *sapje* zebra-arrainak genotipatzeko metodo berri eta sinple bat garatu da. A/T nukleotido bakarreko mutazioak bereiztea zaila izan daiteke eta Sanger bidezko sekuentziazioa izaten da *sapje* arrainak genotipatzeko metodo ohikoena. Metodo hau garestia eta luzea da, eta horregatik, oso erabilgarria da genotipatzeko protokolo merke eta azkar bat izatea. Lan honetan deskribatu den pcPCR teknika erreproduzigarria da eta primer lehiakor hirukote bat erabiltzean datza. Metodo hau oinarrizko edozein laborategitan egin daiteke PCR produktuak genotipoaren baitan agarosa-gel bidezko elektroforesian bereizi daitezke eta. Gainera, HRM analisiarekin ere konbinatu daiteke, eta honi esker lagin asko genotipatu daitezke esperimendu bakarrean. Zehazki 120 enbrioi genotipatu daitezke pcPCR-HRM *setup* bakarrean 384 putzuko plaka erabiliz eta hiruna ale eginez, ondoren inolako prozesamendurik egin gabe. Agarosa-gelean egindako elektroforesiarekin alderatuta, HRM-arekin laginak automatikoki klusterretan bereizten dira eta gel bateko emaitzak interpretatzeak dakarren subjektibitatea saihesten da. Zebra-arrainekin lan egitearen abantaila aipagarria da 2 progenitoreen errunaldi bakoitzean 100-200 enbrioi lortu daitezkeela, eta, beraz, bereziki ohikoa da lagin askorekin lan egitea. Horregatik, hemen deskribatu den teknika, hots, pcPCR-ko

1. KAPITULUA

produktuak HRM bidez klusterretan bereiztea, oso aproposa eta lagungarria da *sapje* DMD arrain-zebra modeloarekin lan egiteko.

Honela, pcPCR metodoa alternatiba simple eta erraz bat da *wild-type* zebra-arrainak *sapje* homozigoto zein heterozigototik bereizteko. Baldintza ezberdinetan jasotako enbrioiak erabili dira lan honetan (paraformaldehidoan fixatu ondoren etanolean gordetako enbrioiak eta izoztutako enbrioiak besteak beste), beraz, nahiz eta DNAREN kalitatea ez den oso altua izan zenbait kasutan, pcPCR-ak beti funtzionatu dut. Ondoren genotipoa identifikatzeko agarosa-gela edo HRM teknika erabili daiteke, eta horrek pcPCR metodoa bereziki moldakorra bihurtzen du, erabilerraza, zuzena eta kostu zein denbora minimoa eskatzen dituena. Horrez gain, HRM analisia ere erabilgarria izan daiteke beste pcPCR batzuekin konbinatuta erabiltzeko, besteak beste mdx saguak genotipatzeko pcPCR-rako deskribatuta dauden primerrekin pcPCR-a egin ondoren (Jin-Hong Shin, Chady H. Hakim & Duan, 2012). Emaitza hauek argitaratzeko bidean daude (Lasa-Fernandez et al., *bidalia*).

AHK molekulek Duchenne muskulu-distrofiaren eredu diren *sapje* enbrioietan duten efikazia aztertze aldera, fenotipo distrofikoa aldatzeko gaitasuna duten edo ez neurtu nahi izan da Waugh-ek deskribatutako protokoloa erabiliz (2014). *Hit* positiboak hautatzearen teknika ez da balekoa izan, progenitore heterozigotoak erabiltzean ez baita Mendelen legea zehatz-mehatz betetzen putzu bakoitzean. Horregatik, baztertu egin da proba honekin jarraitzea AHK familiako molekulen baheketa masiboak egiteko. Dena den, AHK1 eta AHK2ak ez dute fenotipo distrofikoa aldatu tratatutako *sapje* zebra-arrainetan 1 μM -ko kontzentrazioan. Hala ere, tratamenduen kontzentrazioa igo daiteke, 200 aldiz gutxienez, baldintza hauetan *sapje* arrainek fenotipo osasuntsua berreskuratzen duten edo ez begiratzeko.

Azkenik, AHK molekulen efikazia modu sentikorragoan aztertzeko enbrioi osasuntsu zein distrofikoen indarra neurtu da eta bertan aurreko probako kontzentrazio berdina erabiliz AHK1 eta AHK2 molekulak *sapje* arrainen indarra berreskuratze baliotutela ebatzi da. AHK3arekin hobetzeko joera kontzentrazio baxuagoetan lortu da, potentzia farmazeutiko altuagoa duela dirudi honela, nahiz eta aldaketak ez diren estatistikoki adierazgarriak izan. Badirudi kontzentrazioa igotzean efikazia galtzen dutela AHK konposatuek, dosi-dependentsia kanpai formakoa da kasu hauetan. Arner-en taldeak aurrez argitaratutako beste lan batean, Ataluren-ekin 0,5 μM -ko kontzentrazioa lortu zuten emaitza onena, % 58ko berreskuratze-mailarekin, *sapje* enbrioiaren indar aktiboan; eta tratamendu honekin ere kanpai formako dosi-dependentsia deskribatu zuten (Li et al., 2014). Ataluren

sendagaia stop kodon goiztiarrak saltatzeko erabiltzen ari dira hainbat gaixotasun genetikotan, besteak beste, Duchenne muskulu-distrofian entsegu klinikoetako fasean dago. Sendagai honek distrofinaren ortologoa den genearen adierazpena berrezartzen du, AHKaren ekintza-mekanismoa, aldiz, gene hau ez izateak dakarren albo-kalte bat konpontzea da, eta beraz, indarrean hobekuntza hauek lortzea, distrofinaren ortologoaren adierazpena berrezarri gabe, emaitza ona dela esan daiteke.

S107 eta ARM210en indize terapeutikoa ez da zehaztu, ez baita efikazia neurtzeko indar-neurketarik egin tratamendu hauekin. Dena den, AHK konposatuen antzeko potentzia izango balute, toxikotasun-probetan eskuratutako datuek adierazten dute AHK molekulen leiho terapeutikoa ARM210arena baino 4 aldiz zabalagoa izango litzatekeela. Tratamendu konbinatu gisa AHK molekulak eraginkorrak izan daitezkeela ondorioztatu da honela.

Laburbilduz, lan honetan, *sapje* zebra-arrainak genotipatzeko teknika simple bat deskribatu da, ondoren hauekin lan egitea erraztuko duena. Gainera, hainbat AHK konposaturekin zebra-arrain enbrioak tratatu eta gero esan daiteke, batetik, S107 eta, batez ere, ARM210 Rycals-ek baino toxikotasun gutxiago dutela eta, bestetik, AHK1 eta AHK2k indar aktiboa hobetzen dutela 1 μ M-era bereziki, nahiz eta ez duten fenotipo distrofikoa erreskatatzen *sapje* arrainetan.

2. KAPITULUA

AHK2 molekularen eraginkortasuna mdx saguen giharretako, bihotzeko eta nerbio-sistema zentraleko fenotipo distrofikoan

SARRERA

Duchenne muskulu-distrofia (DMD) X kromosomari lotutako gaitza da eta gihar eskeletikoen galera, kardiomiopatia eta zenbait kasutan desgaitasun kognitiboa eragiten ditu (Cuisset & Rivier, 2016). Gaixotasun genetiko hau distrofinaren geneko hainbat mutaziok eragiten dute, distrofinaren adierazpena desgaitzen dutenak zehazki; kasuen % 30 *de novo* sortutako mutazioen erruz izaten dira eta batez beste mutiletan 3500-5000tik 1eko intzidentzia du (Hoffman & Schwartz, 1991). Distrofina sarkoleman, hots, gihartzelulen mintzean, kokatzen den proteina da eta uzkurdua-makinaria eta mintz extrazelularren arteko lotura ahalbidetzen du. Distrofina falta denean mintzaren egonkortasuna kolokan gelditzen da eta honek zuntz distrofikoen hauskortasuna eta kalte-suszeptibilitatea areagotzen du (Gao & McNally, 2015), izan ere, uzkurduren ondorioz, distrofinak betetzen duen indargetzaile edo motelgailu lanaren babesik gabe, kaltzio-sarrera anormalak ematen dira, besteak beste (Allen, Whitehead, & Froehner, 2015). Ezohiko kaltzio-sarrerek, estres nitro-oxidatzailearekin eta aldatutako mitokondrioaren funtzioarekin batera (Pauly et al., 2017), ziklo biziotsu bat eragiten dute, kaltzio intrazelularren mailak igoz eta giharren disfuntzioa eta nekrosi progresiboa eraginez (Deconinck & Dan, 2007).

Hainbat lanetan distrofina ez izateak kaltzioaren homeostasia desorekatzen duela egiaztatu dute bai gizakietan, bai eta DMD ikertzeko gehien erabili izan den mdx saguan ere. Atsedeen-egoeran kaltzio-maila igota dagoela ikusi da gihar eskeletikoko zelulen zitosoloan, eta ROS-RNS errektibo askeen mailak ere gora egiten du distrofinarik gabeko zuntzetan (Vallejo-Illarramendi, Toral-Ojeda, Aldanondo, & López de Munain, 2014). Fenomeno berbera deskribatu izan da distrofinarik gabeko bihotzetako zeluletan ere (Fanchaouy et al., 2009), eta, berriki, distrofina-absentziak neuronetan efektu berdina sortzen duela adierazi dute mdx saguetan (Lopez et al., 2016). Erretikulu sarkoplasmikotik espontaneoki ateratzen diren kaltzio-txinparta edo *spark*-en frekuentzia altuagoa da gihar-zelula distrofikoetan, (Wang, Tu, Rappel, & Levine, 2005), eta bueltan erretikulura sartzen den kaltzio-absortzioa, aldiz, motelduta dagoela deskribatu da (Mázala et al., 2015), hau da, RyR (rianodina-hartzailea) kaltzio-kanalen eta SERCA-ren (erretikulu sarko/endoplasmikoko kaltzio-ATPasa) funtzioak aldatuta daude Duchenne muskulu-distrofian.

Marks-en taldeak (Bellinger, Mongillo, & Marks, 2008) mdx saguetan RyR kaltzio-kanalak ROS-RNS erradikalen bidez eraldatuta daudela frogatu zuen, eta eraldaketa hauek RyR-

2. KAPITULUA

etik kalstabina izeneko proteina egonkortzailea askatzea eragiten du. Kalstabina egonkortzailerik gabe rianodina-hartzaileak ez dira behar bezala itxita gelditzen, kaltzio-jarioak eraginez; honek kaltzio intrazelularren homeostiaren desoreka dakar eta aldi berean uzkurduan ezinbestekoa den kaltzio-seinalizazioa desregulatzen du, azkenik giharren ahultasuna sortuz (Andersson & Marks, 2011). RyR eta kalstabinaren arteko elkarrekintza mantentzeko helburuarekin sortu dira Rycals familiako molekulak. Andrew R. Marks-ek sortutako S107 konposatuak RyR1 eta RyR2 modulatu dituela erakutsi dute mdx saguen giharretako eta bihotzeko funtzioa hobetuz (Bellinger et al., 2009; Fauconnier et al., 2010). Ildo berari jarraituz, Ahulken (AHK) izeneko molekula-familia sortu zuen Jesus Maria Aizpurua doktoreak, Adolfo López de Munain eta Ainara Vallejo doktoreekin elkarlanean. AHK1 eta AHK2 (lehen A6 eta A7 izenarekin ezagunak) molekulak erabili zituen Aldanondok bere tesian (2017) 5 asteko tratamenduen ondoren mdx saguetan funtzio muskularra aztertzeko. Lan horretan, besteak beste, tratamenduek aurreko hanken euste-indarra *in vivo* eta *tibialis anterior* giharraren indarra *in vitro* hobetzen zutela erakutsi zuen, gainera serumeko CK mailan AHK molekulak jaitsierak eragiten zituztela ikusi zuen eta histologian zein FDB fibretako kaltzio intrazelularrean ere hobekuntza nabarmenak atzeman zituen tratamenduen ondorioz. Berriki, Marks-en molekula berria den ARM210 konposatuaren efektua aztertu dute 4 eta 12 asteko tratamenduen ondoren mdx saguetan, eta funtzio muskularrean hainbat hobekuntza dakartzala ebatzi dute (Capogrosso et al., 2018).

Beraz, RyR-kalstabina lotura berreskuratzea eta kaltzio-jarioak ekiditea Duchenne muskulu-distrofiari aurre egiteko diana terapeutikoa izan daitekeelakoan, lan honetan AHK2aren efektua aztertu da bost asteko adina duten mdx saguei konposatu hau edarian 0,25 mg/ml-ko kontzentrazioan 12 astez administratu ondoren. Aurrez 5 asteko tratamenduetan dosi honekin gihar-mailan lortutako hobekuntzak, (Aldanondo, 2017), tratamendu luzeagoarekin mantentzen ote diren argitzeaz gain, lan honen helburu nagusia lehen aldiz AHK2ak bihotzeko eta nerbio-sistema zentralerako fenotipo distrofikoan duen eraginkortasuna aztertzea da. AHK2 molekula bereziki barrera hematoentzefalikoa gainditzeko diseinatu da, eta, *in silico* eginiko probetan iragazkorra dela ikusi bada ere, hemen ebatziko da benetan hala den. 12 asteko iraupeneko tratamenduen aldeko hautua egin da, izan ere, mdx saguek beranduago azaleratzen dute bihotzari zein kognizioari lotutako sintomatologia giharretako kalteekin alderatuz.

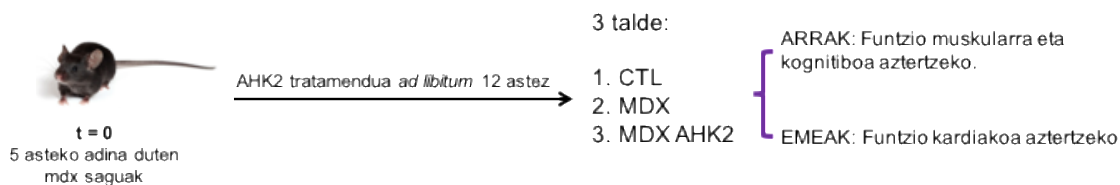
Entsegu prekliniko hauetan *TREAT-NMD Neuromuscular Network*-ek iradokitako operazio-prozedura estandarizatuak, SOP, edo aurrez literaturan deskribatu diren beste

zenbait protokolo erabili dira giharretako, nerbio-sistema zentraleko eta bihotzeko funtzioak ikertzeko.

MATERIAL ETA METODOAK

Animaliak eta tratamendua

C57BL/10ScSn-DMDmdx/J saguak (aurrerantzean MDX) eta C57BL/10ScSnJ saguak (aurrerantzean kontrolak edo CTL) The Jackson Laboratory-n eskuratu ziren (Bar Harbor, ME, USA) eta Biodonostiako animaliategian, 12 orduko argi-zikloekin eta jana zein edana *ad libitum* eskuratzeko moduan, kolonia mantendu eta jatorri berdina izan dezaten gurutzatzeak egin eta genotipatu egin dira primer lehiakor bidezko PCRak eginda (Jin-Hong Shin, Chady H. Hakim & Duan, 2012). Esperimentu honetarako adinean bat datozen bost asteko sagu kontrolak eta mdx saguak hautatu eta ausaz taldekatu dira. Tratamenduak biberioetan administratu dira *ad libitum*, AHK2a animaliategiko urarekin diluitu ondoren 0,25 mg/ml kontzentrazioan. Giharreko eta nerbio-sistema zentraleko fenotipoa aztertzeko sagu arrak erabili dira mdx saguetan ohikoa den bezala, baina bihotzaren funtzioa ikertzeko emeak hautatu dira, animalia-eredu honetan emeek fenotipo kardiako larriagoa dutelako arrek baino (Bostick, Yue, & Duan, 2010). Edan duten bolumena eta saguen pisua kontrolatu da saiakuntzan zehar. Esperimentu hauek guztiak Donostiako Unibertsitate Ospitaleko IIS Biodonostiako Animalia Esperimentazioaren Batzorde Etikoak onartutako protokoloak jarraituz egin dira.



1. IRUDIA. Diseinu experimentalak.

AHK2aren toxikotasunaren azterketa

12 asteko tratamenduak egin zaizkien saguen gibel zati bat eta giltzurrun bat % 4 paraformaldehidoan fixatu dira 24 orduz eta ondoren 1X PBSan gorde dira. Tratatu gabeko 3 sagu kontrol eta 3 mdx sagu eta 0,25 mg/ml-ko AHK2 dosiarekin tratatutako 3 sagu kontrol eta 3 mdx sagu erabili dira. Lagin hauen histopatologia aztertu da H&E

2. KAPITULUA

tindaketaren bidez lesioak dauden edo ez ikusteko. Azterketa hauek Madrileko *Universidad Complutenseko* Esperimentaziorako Animalien Patologia Zerbitzuak egin ditu.

AHK2aren kontzentrazioa laginetan

AHK2 molekularen eta RF6 eta RF8 deituriko bere bi metabolitoen kontzentrazioak neurtu dira tratatutako saguen lagin ezberdinetan, -80 °C-ra gordeta zeuden gastroknemio eta *vastus lateralis* (VL) giharretan, garunetan eta bihotzetan zehazki.

Laginei nitrogenu likidoa gehitu eta almerariza izotz lehorretan dagoela txikitu dira. Bakoitzetik 100 mg pisatu eta 100 µl proteina erauzteko agente prezipitatzailerik gehitu zaie (% 1 formiko azetonitriloan). Ultrasoinuarekin 10 segundoz astindu ostean, 10.000 rpm-ra zentrifugatu dira 5 minutuz. Ondoren, gainjalkinak berreskuratu dira eta LC-MSMS bidez analizatu ditu EHUko SGIker Ikerkuntzarako Zerbitzu Orokorretako Mamen Sampedro teknikoak (Gasteiz).

Patroiekin egindako entsegu esperimentalak eta bibliografia-berrikuspenak oinarritzat hartuta diseinatu da neurraketa-metodoa. Teknika honek 3 konposatu (AHK2, RF6 metabolitoa eta RF8 metabolitoa) determinazio kuantitatiboa ahalbidetzen du.

HPLC-rako kromatografia-baldintzak:

Zutabea: NB ZORBAX SB-C18 2.1 x 100mm, 3.5µm

Fase mugikorra (urtsua): 5 mM Fto. Amonikoa + % 0.1 formikoa

(organikoa): ACN

Konposizio-gradiente fase mugikorrean

Fase mugikorraren fluxua: 0.3 ml/min

Analisi-denbora: 15 min

Post-run oreka-denbora: 5 min

Zutabearen tenperatura: 30 °C

Injekzio-bolumena: 5 µl

Ionizazio-iturriaren baldintzak:

Interfasea: ESI positiboa

Lainoztagailua: 35 psi

Lehortzeko gasaren fluxua: 9 L/min

Gasaren temperatura: 350 °C

Kapilarraren tentsioa: pos 3000 V

1. TAULA: Masa-espektrometroko neurketen baldintzak.

Konposatua	MRM segmentua	loi prekurtsorea (m/z)	loi produktua (m/z)	Zatitzailea (V)	Kolisio energia (V)
RF8	0-6 min	309	126	75	15
RF8		309	72	75	15
AHK2	6-15 min	293	125	75	12
AHK2		293	72	75	15
RF6		222	52	75	15
RF6		222	54	75	15

Kuantifikazio-mugak (LOQ) eta kalibratzea:

LOQak kalkulatzeko matrize zuriari (sagu kontrolen ehunak, kasuan kasu, garuna, bihotza eta giharra) 3 konposatuen gutxituz doazen kontzentrazioak gehitu zaizkio. LOQ bezala definitu da desbideratze estandar erlatiboa \leq % 20 duen eta kuantifikatu daitekeen kantitate minimoa. Kalibrazio-kurbak estimazio lineal bidez egin dira, eta kasu guztietan korrelazio-koefizientea \geq 0,99 izan da.

AHK2aren biodistribuzioa

AHK2aren biodistribuzio-azterketak egin dira arratoietan Jordi Llop doktoarekin kolaborazio bidez CIC biomaGUNE (Donostia). Batetik, AHK2 molekula bere ezaugarriak aldatuko ez dituen ^{11}C radio-isotopoarekin markatu da eta isatseko zainetik injektatu zaie animaliei anestesiaturik daudela. AHK2aren bioerabilgarritasuna aztertu da PET bidez. Bestetik, AHK2 eta bere metabolitoen presentzia aztertu da garunean. Horretarako 1 μg AHK2a isatsetik injektatu da eta 15 minutura garuna erauzi eta konposatu ezberdinak kuantifikatu dira HPLC bidez.

Funtzio muskularra aztertzeko probak

Proba hauek sagu arretan egingo dira.

Neke-proba

Tratamendua hasi eta 12 asteetara saguek korrika egiteko zinta, Panlab *Treadmill* (Harvard Apparatus), erabili da nekea neurtzeko. Aurrez, bi egunetan, saguak aparatura ohitzeko 20 minutuko entrenamenduak egin dira 12 cm/s-ko abiaduran eta geldituz gero 0,4 mA-ko intentsitate baxuko deskarga elektrikoak aplikatuz (Grange & Luca, 2013). Proba egitean, korrika egiteko zinta horizontalean dagoela, zinta hasierako 5 minutuetan 8 cm/s-ko abiaduran mantendu da eta ondoren minutuko 2 cm/s igo da abiadura. Honela, sagu bakoitzak nekatu arte egindako distantzia neurtu da. Sagu bat nekatuta dagoela esan da minutu batean jarraian korrika egiteko gai ez denean eta minutu bakarrean hiru aldiz baino gehiago deskarga elektrikoen gunean gelditzen denean (Capogrosso et al., 2018).

Euste-indarraren neurketa

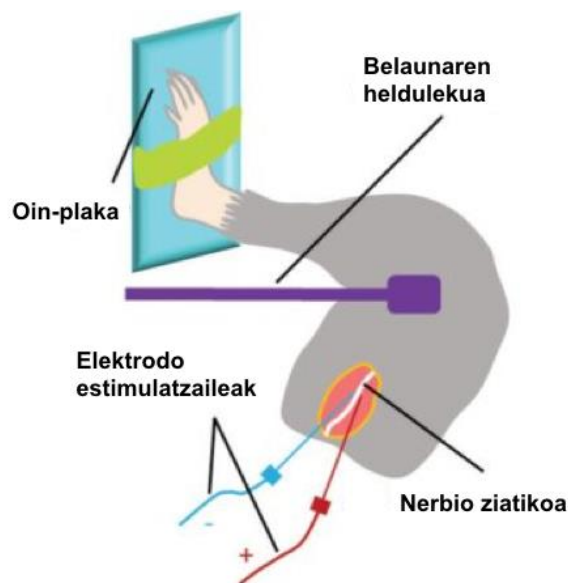
Aurreko gorputz-adar edo hanken euste-indarra neurtu da *grip strength meter* (Bioseb) neurgailua erabilia eta protokolo estandarra jarraituz (Luca, 2008). Saguak isatsetik heldu eta aurreko hankekin burdinsarea eusteko erabili duten indarra bost aldiz neurtu da animaliaiko. Neurketa bakoitzaren artean minutu bateko atsedean tartea eman zaie saguei eta soilik hiru neurri handienak hartu dira batezbestekoa kalkulatzeko. Datuak sagu bakoitzaren pisuarekin normalizatu dira.

Oin-zolako gihar flexoreen indarraren neurketa in vivo

Gastroknemioak, soleoak eta oineko giharrek oin-zolako gihar flexoreen taldea osatzen dute, eta hauek kaltetuta daudela deskribatu da bai DMD gaixoetan bai eta mdx saguetan ere (Baltgalvis, K.A; Call, J.A; Cochrane, G.D; Laker, R.C; Yan, Z; Lowe, 2012). Aurora Scientific *3 in 1* aparatua (Ontario, Kanada) erabiliz saguen oin-zolako gihar flexoreen funtzioa aztertu da *in vivo*, eta, horretarako, saguak isofluranoarekin anestesiaturatu mantendu dira probak iraun duen artean. Saguak lokartu eta berehala lubrifikatzaile okularra jarri zaie begietan eta ezker hanka depilatu zaie ondoren errazago maneiatzeko. Honela, sagua 37 °C-ra dagoen plaka batean buruz gora eta ezker hanka 90°-ko angeluan igota kokatu da, ezkerreko orpoa oin-plakako hutsunean zinta itsasgarri batekin eutsita duela eta belauna heldulekuekin lotuta duela mugitu ez dadin (2. IRUDIA).

Oin-zolako gihar flexoreak elektrikoki estimulatu dira 10 mA-ko korrante intentsitatearekin izterretik igarotzen den nerbio ziatikoan ezarri diren bi elektrodoen bidez eta oinaren mugimenduak eragindako indarra neurtu da oin-plakako indar transduktoreei esker. Hau guztia aurrez deskribatuta dagoen protokolo bat jarraitu eta egokituta egin da (Call, 2015).

Twitch edo pultsu isometrikoaren indarra neurtu da lehenik eta behin. Kontrakzio isometrikoa giharraren luzera bere horretan mantentzen duena da, eta *twitch*-a pultsu elektriko bakarra da, akzio-potentzial bakarraren baliokidea litzatekeena. Ondoren, indar tetaniko isometriko maximoa neurtu da. Estimuluak frekuentzia motelean ematen badira giharrak erlaxatzeko denbora izango du pultsuen artean, baina frekuentzia altuan kitzikatzean, pultsuak gainjarriko dira eta kontrakzio tetanikoa lortuko da, azken hau gihar batek sortu dezaken indar maximoa neurtzeko erabiltzen da (Chris & In, 2016). 10, 30, 50, 80 eta 100 Hz-ko frekuentzian eta 500 ms-ko iraupena duten kitzikadura ezberdinak eragin dira bakoitzaren artean bi minutuko tarteak utziz, eta frekuentzia-indarra erlazio horretatik indar tetaniko isometriko maximoa lortu da. Indarra oin-plakaren luzerarekin biderkatu (0,04 m) eta saguen gorputz masarekin normalizatu da ($\text{mN}\cdot\text{m}/\text{kg GM}$) (Zhao et al., 2017).



2. IRUDIA. Nerbio ziatikoa estimulatuz oin-zolako gihar flexoreen indarra neurtzeko muntaiaren eskema. Egokitutako irudia (Zhao et al., 2017).

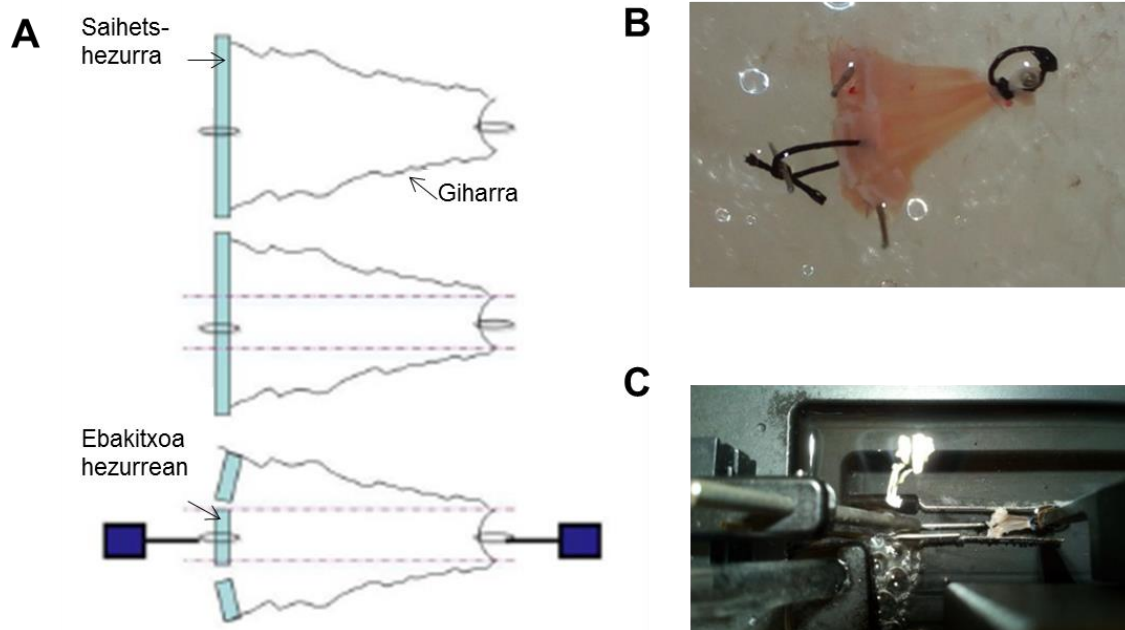
Diafragmaren indarraren neurketa in vitro

Mdx saguetan diafragma da progresio patologiko adierazgarriena duen giharra. Hortaz, fibrosia ekidin dezaketen agente terapeutikoak ikertzerakoan diafragma aztergai egokia

2. KAPITULUA

da (Moorwood, Liu, Tian, & Barton, 2013) eta *in vitro* eginiko neurketa hauetan diafragmaren parametro fisiologikoak aztertu dira.

*In vivo*ko azkeneko fasean, saguak anesthesiatu eta odola atera ondoren, diafragma inguruan dituen saihets-hezurrekin batera erauzi da. Berehala, baldintza fisiologikoetan mantentzeko, *Mammalian Ringer* izeneko soluzio oxigenatuan jarri da, buffer honen konposizioa honakoa izanik (mM): NaCl 137; NaHCO₃ 24; glukosa 11; KCl 5; CaCl₂ 2; MgSO₄ 1; NaH₂PO₄ 1 eta pH-a 7,4ra doituta. Diafragmaren funtzio uztegarria aztertzeko saihets-hezurretik erdiko tendoira doan 4 mm inguruko zabalera duen gihar-tira bat erabili da, eta horretarako zetazko hariarekin korapilo bat egin da diafragmatiraren punta bakoitzean. Giharra moztekoan ertzetako zuntzak kaltetzen direnez, triangelu forman moztu da diafragmaren ezkerrekoa, tendoia triangeluaren erpinetako bat delarik, eta saihets-hezurrean, korapiloaren bi aldeetan, ebaki ñimiñoak egingo dira 3. irudian (A eta B) ikusi daitekeen bezala (Barton & Lynch, 2008); modu honetan indarra neurtuko den diafragmaren tira edo laukizuzeneko gihar-zuntzak ukitu gabe egongo dira. Diafragma Aurora Scientific aparatuko *in vitro*ko *setup*-eko bi euskarri metalikoetara lotu eta *Mammalian Ringer*a duen kameran ere O₂-aren perfusio jarraitua mantendu da (3. IRUDIA, C). Neurketa hauek giro-tenperaturan egin dira.



3. IRUDIA. Diafragmaren diseinua eta muntaketa. (A) Diafragmaren diseinuko pausuen eskema. Egokitutako irudia (Barton & Lynch, 2008). (B) Saguen diafragmaren diseinua erabiltzeko prest. (C) Diafragmaren diseinua indarra neurtzeko Aurora Scientific 3 in 1 aparatuan muntatuta.

Giharrak erauzi eta estimulazio elektrikoa erabili daiteke uzkurto daitezen, eta puntu horretan giharraren luzera berdin mantendu daiteke (kontrakzio isometrikoa), laburtu egin daiteke (kontrakzio konzentrikoa) edo luzatu egin daiteke (kontrakzio eszentrikoa) (Barton & Lynch, 2008).

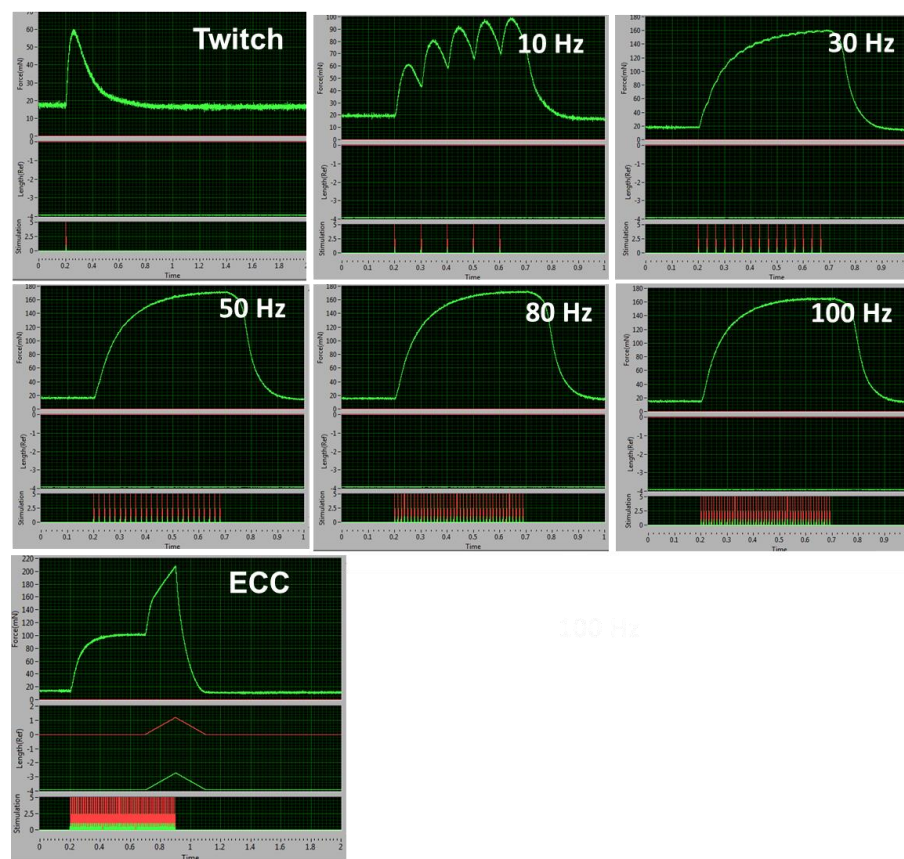
Indarra *in vivo* neurtzeko protokoloan bezala, twitch edo pultsu isometrikoaren indarra neurtu da hasteko. Kasu honetan 1 A-ko korrante intentsitatea erabili da. Hainbat twitch egin dira eta balore maximoa eskuratzean luzera optimoa dela ebatzi da, luzera hau (L_O) kalibrearekin neurtu da. Ondoren, indar tetaniko isometriko maximoa neurtu da. Kasu honetan ere frekuentzia-indarren erlazioa aztertzeko 10, 30, 50, 80 eta 100 Hz-ko frekuentzian 500 ms irauten duten kitzikadura jarraituak eragin dira bakoitzaren artean bi minutuko tarteak utziz, eta datu hauetatik indar tetaniko isometriko maximoa lortu da. Indarraren balore absolutuak (P , mN) indar espezifiko (sP , $\text{mN}\cdot\text{mm}^2$) gisa adierazi dira ondorengo formula erabiliz:

$$sP = \frac{P}{\frac{\text{masa}}{L_f \times D}}$$

Masa indarra neurtzeko erabili den diafragma zati laukizuzenaren pisua da; L_f (giharruntzen luzera) lortzeko L_O (luzera optimoa), hots, kasu bakoitzean kalibrearekin neurtu den diafragma zatiazen luzera bider zuntzetarainoko luzera ratioa (*length-to-fiber length ratio*) egin behar da, ratio honen balioa 1 da diafragmaren kasuan; eta D gihar eskeletikoaren dentsitatea da, 1.06 g/mm^3 hain zuzen (Capogrosso et al., 2018).

Kontrakzio isometrikoen neurketa hauek guztiak giharraren indarra ebaluatzeko balio dute. Aldiz, kontrakzio eszentrikoak sarkolema edo gihar-mintzaren egonkortasuna aztertzeko erabili ohi dira (Moorwood et al., 2013), eta mdx saguek sarkolema kaltetuta dutenez tratamenduaren eragina aztertzeko erabili da. Diafragma % 10 luzatu da uzkurdu eszentrikoa aztertzeko, eta bi minutuz behin bost aldiz 150 Hz-ko frekuentzian 500 ms irauten duten kitzikapenak egin dira eta puntu honetako balore maximoa hartu da, ondoren giharra bere onera itzuli eta 200 ms gehiago erregistratu dira frekuentzia berdinean. Datu hauek hasierako puntuaren ehuneko gisa adierazi dira.

2. KAPITULUA



4. IRUDIA. *In vitro* diafragmaren indarra neurtzeko hainbat protokolo (twitch edo pulsu isometrikoa, indar tetaniko maximoa neurtzeko frekuentzia-indarrak 10, 30, 50, 80 eta 100 Hz-ra eta ECC edo indar eszentrikoa) egin ondoren lortzen den indarraren balioa, giharraren luzera eta estimulazioen frekuentziak adierazten dituzten grafikoak.

CK eta MYOM3 proteina-mailak serumean

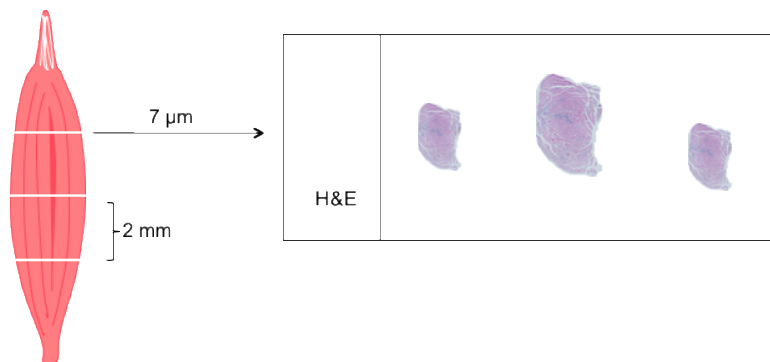
Saguak isofluranoarekin anestesiatu eta burua moztu zaie ondoren lepotik irteten den odola jasotzeko 12 asteko tratamendua izan duten saguetan. Odola BD Microtainer® SST hodietan bildu da. 5 minutuz koagulatzen utzi ondoren odol-laginak hotzean mantendu dira seruma eskuratzeko protokoloarekin jarraitu aurretik. Behin odol-lagin guztiak eskuratuta, 6000 g-ra zentrifugatu dira 10 minutuz 4 °C-tan, eta gainean gelditzen den seruma -80 °C-tan gorde da.

Serumean dagoen kreatina kinas (CK) kontzentrazio neurketak Donostia Ospitale Unibertsitarioko Biokimika Zerbitzuan egin dira, gizakientzat estandarizatutako teknika fotometrikoak erabiliz. Laginak hotzean mantendu dira neurketak egin arte eta hemolisia duten, hots, odoleko globulu gorriak apurtuta dituzten, serum laginak baztertu egin dira.

Serumeko MYOM3 proteina-maila Western Blot teknikaren bitartez neurtu da. Horretarako seruma 3/10 proportzioan diluitu da urarekin eta 4X lagin-bufferra gehitu ondoren (250 mM Tris pH 7,5, % 20 glizerola, % 8 SDS, % 20 b-merkaptotetanola eta 5 mg/ml bromofenol urdina) laginak 100 °C-ra irakin dira 5 minutuz proteinak desnaturalizatzeko. Proteinak elektroforesi bidez banatu dira Mini-Protean TGX % 4-20ko gradienteak duten geletan (Bio-Rad) eta, ondoren, proteinak geletik nitrozelosazko mintzetara transferitu dira; hau guztia Bio-Rad ekipamenduarekin gauzatu da eta pisu molekularren markatzaile gisa Precision Plus Protein Standards (All Blue, Bio-Rad) erabili da. Mintzak Ponceau gorriarekin tindatu dira kargatutako lagin guztien proteina-maila berdintsua izan dela ziurtatzeko. Ondorengo pausua mintza ordubetez % 5 esne duen TBST-an blokeatzea da, antigorputzen hibridazio ez-espezifikoak ekiditeko. Miomesina 3 proteina identifikatzeko MYOM3 Rabbit PolyAb (1:1000, Proteintech) antigorputz primarioarekin inkubatu dira mintzak gau osoan zehar 4 °C-tan. Mintzak garbitu ostean, Alexa Fluor 647 antigorputz sekundario fluoreszentearekin (*Goat anti Rabbit*, 1:1000, Invitrogen) inkubatu dira ordubetez eta iBright FL100 (Invitrogen) aparatuarekin fluoreszentzia irudiak eskuratu dira, ondoren Image Studio Lite 5.2 softwarearekin kuantifikatzeko.

Histologia: nukleo zentralak

Diafragma eta TA giharra zuzenean nitrogenu likidoan hoztutako isopentanoan izoztu dira eta diafragmaren eskuinaldea OCT (*optimal cutting temperature compound*) molde batean dagoela izoztu da modu berean. Histologia aztertzeko 7 µm-ko zeharkako mozketak seriatuak egin dira Leica-ko CM1950 kriostatotan.



5. IRUDIA. *Tibialis anterior* giharrean 7 µm-ko zeharkako mozketak egin dira 2 milimetrotz banaturiko 3 guneeetan ondoren H&E tindaketa egiteko.

2. KAPITULUA

Gihar distrofikoaren patologia aztertzeko hematoxilina eta eosina (H&E) tindaketa egin da Biodonostiako Histologia Plataforman. H&E tindaketarako Varistain Gemini ES aparatua erabili da eta ondorengo protokoloa jarraitu da:

- 1) Tindaketa:
 - a. Laginak hematoxilinan mantendu dira minutu batez.
 - b. Tindagai soberakinak urarekin garbiketak eginez kendu dira 1,5 minutuz.
 - c. Alkohol azidoan 10 segundoko murgilketa bat egin da.
 - d. Urarekin 30 segundoz garbitu da.
 - e. Amoniako uretan murgildu da 30 segundoz.
 - f. Urarekin 30 segundoz garbitu da.
 - g. Portak eosina alkoholikoan murgildu dira 30 segundoz.
- 2) Laginak deshidratatu:
 - a. % 96 etanolean minutu bateko murgilketak egin dira bi aldiz.
 - b. % 100 etanolean minutu bateko murgilketak egin dira bi aldiz.
- 3) Garbiketa: Xilenoarekin 3 minutuko bi garbiketa egin dira.
- 4) Muntaia: laginei Shandon Consul-Mount muntatzailea gehitu eta beirazko estalkia jarri zaie.

Talde bakoitzeko 5 animalia aztertu dira. Argazkiak Nikon Digital Sight kamera digitala, Nikon Eclipse 80i mikroskopia eta NIS elements irudiak prozesatzeko softwarea erabilia egin dira. Diafragma eta TA giharretan nukleo zentrala aztertzeko saguko 3-4 argazki egin dira lagin bakoitzeko 10X objektiboarekin (guztira animalia bakoitzeko 60 gihar-zuntz aztertu dira). Ondoren 20X eta 40X objektiboak erabili dira lagin adierazgarrien irudiak hartzeko.

Funtzio kardiakoa aztertzeko esperimentuak

Proba hauek sagu emeeetan egingo dira Gema Ruiz Hurtado doktorearen *Cardiorenal Laboratoryn* egin dira, Madrileko *12 de Octubre* ospitalean (tesiko egonaldian zehar).

Elektrokardiograma (EKG)

Bihotzaren funtzioa *in vivo* ikertzeko elektrokardiogramak (EKG) egin dira. Horretarako, saguak % 1,5 isoflurano gasarekin anestesiatu ondoren, buruz behera jarri dira sentso metalikoan 37 °C-tara berotuta dagoen animalia txikien fisiologia monitorizatzeko

sistemako plataforman (Harvard Apparatus), 6. irudia, eta hankak gel eroalearekin estali dira konexio elektriko egokia ziurtatzeko (Navarro et al., 2019). EKG erregistroak LabChart 7.0.-ko fitxategi bitarretara bihurtu eta software hau erabiliz sagu bakoitzeko aurreneko 5 minutuetako emaitzak aztertu dira, minutu bakoitzaren hasierako 12 taupadak zehazki, denera 60 taupada saguko (ADInstruments, Sydney, Australia).

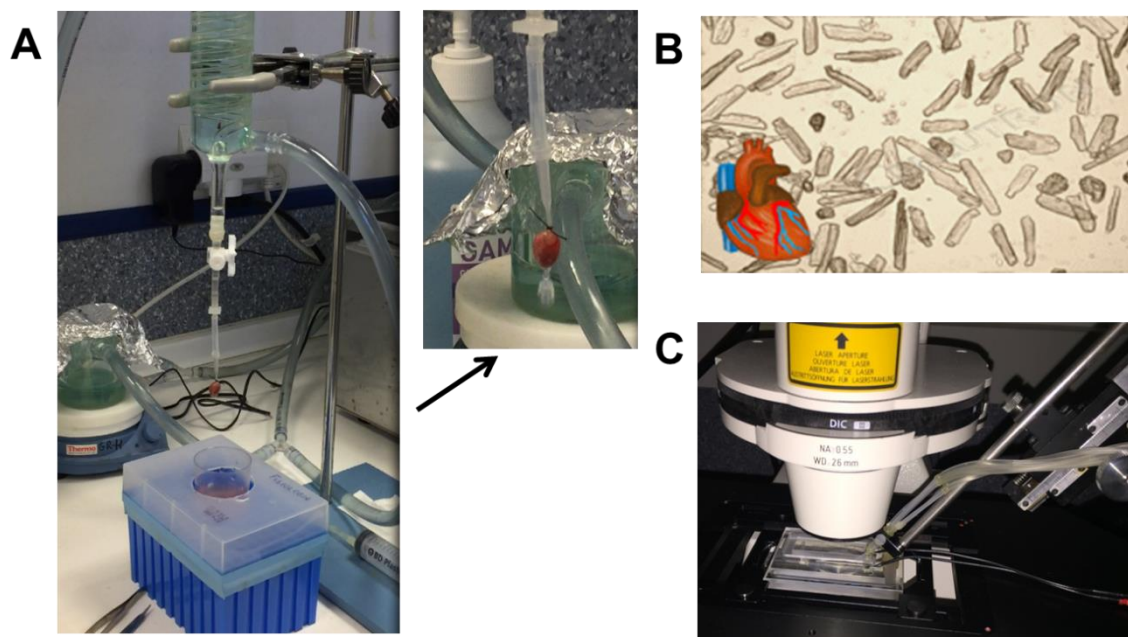


6. IRUDIA. Elektrokardiogramak egiteko erabili den aparailua (Faraday kaxa baten barruan sartu da seinale arrotzak murrizteko).

Kaltzioa kardiomiozitoetan

Saguak pentobarbitala (100 mg/kg) injektatuta anesthesiatu dira eta jarraian heparina xiringatu zaie (4 U/g), bi injekzioak intraperitonealak izan dira. Bihotza atera eta, berehala, aorta kanulatu da; ondoren, Langendorff bidez kolagenasa II-arekin (Worthington, Lakewood, NJ, AEB) bentrikulua perfunditu eta kardiomiozitoak isolatu dira Shioyak argitaratutako protokoloa jarraituz 7. irudian ikusi daitekeen moduan (Shioya, 2007). Segidan, kaltzioaren alterazioak aztertzeko kardiomiozitoak mintza iragazten duen zunda fluoreszentearekin, Fluo-3AM (5 mmol/L), kargatu dira (Navarro et al., 2019). Mikroskopia konfokalean (Meta Zeiss LSM 710, 40x) eskuratu dira irudiak eta IDL softwarea erabili da kuantifikazioarako (Research System Inc., Boulder, CO, AEB).

2. KAPITULUA



7. IRUDIA. Kardiomiozitoen erauzketa eta kaltzioaren azterketaren irudiak. **(A)** Langendorff aparatuan digestio-entzimarekin perfunditu da bihotza. **(B)** Kardiomiozito helduen argazkia. **(C)** Mikroskopia konfokala eta kaltzinoa aztertzeko erabili den elektrododun plaka berezia.

Batetik, kaltzioaren trantsitorio zitosolikoak aztertu dira sistolean, kardiomiozitoak bi elektrodoekin 2 Hz-ra estimulatuta. Estimulazio bidez uzkurdura eragiten da (*cell shortening*), eta, honela, erretikulu sarkoplasmatikotik kaltzinoa atera eta sartzen duten kanalen egoera, RyR eta SERCA hurrenez hurren, zein den jakin daiteke. Fluoreszentziaren balio maximoa (F) fluoreszentzia basalarekin (F₀) normalizatu da ratioa lortzeko (F/F₀), eta erorketaren denbora (Tau) kaltzioaren jaitzieraren malda da. Bestetik, diastolean edo zelula erlaxatuta dagoela *spark* edo kaltzio-irteera espontaneoak grabatu dira. Diastolean ateratzen diren kaltzio-txinparta hauen erantzuleak gaizki itxitako RyR kanalak dira, eta hau da, hain justu, AHK molekularen jomuga.

Histologia

Bihotzeko histologia aztertzeko izoztutako laginen mozketak egin dira aurreko atalean azaldu den bezala. Ondoren nekrosia eta fibrosia ikusteko H&E tindaketa eta Masson trikromiko tindaketa erabili dira hurrenez hurren. Azken hau *Bio Optica*-ko kita erabiliz egin da. Ondoren sekzio osoaren zeharkako argazkiak atera dira Nikon Digital Sight kamera digitala, Nikon Eclipse 80i mikroskopia eta NIS elements irudiak prozesatzeko softwarea erabilia. 10X objektiboarekin eta "*acquire large image*" funtzioarekin sekzio osoa TIFF formatuko irudi bakarrean gorde da, softwareak berak mosaiko moduan

ateratako kasuan kasu 6-12 argazkiak batu eta gero. Nekrosi-gunea erraz identifikatu daiteke H&E tindaketarekin, gihar-zuntzek egitura galtzen baitute eta hantura-zelulak infiltratzen baitira euren tokian, argazkian gune moreak eta nukleo askokoak identifikatuz

Funtzio kognitiboa aztertzeko probak

Proba hauek sagu arretan egingo dira.

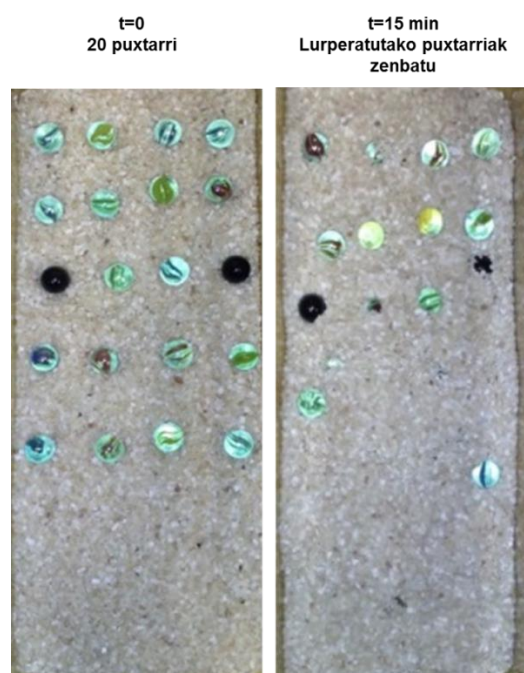
Freezing testa

Saguak buruz gora, emeki baina irmo, immobilizatu dira 15 segundoz, saguei laborategian ohiko azterketak egiterakoan edota injekzio intraperitonealak administratzerakoan eusten zaien posturan alegia. Ondoren, 45 x 45 x 45 cm-ko kutxa batean sartu dira eta saguaren mugimenduak grabatu dira bost minutuz *Smart video tracking software* (Panlab, Harvard Apparatus) erabilita. Saguen portaera neurtzeko proba bat denez, sagu guztiak ordu berean testatu dira, arratsaldeko 14:00etatik aurrera hain zuzen. Hasierako immobilizazio horrek eragindako estres akutuaren ondorioz sagu batzuk geldi-geldi geratzen dira denbora jarraian, izoztuta bezala, eta erantzun honi *freezing response* edo erantzun geldiarazlea deitzen zaio (Goyenvalle et al., 2015). 5 minutu horietatik izoztuta bezala gelditu diren denboraren ehunekoa neurtu da. Gainera, emaitza hauek normalizatzeko, beste egun batean sagu berberak baina aurrez immobilizatu gabe, hau da, estresik eragin gabe, beste bost minutuz grabatu dira; estresaren eraginik gabe izoztuta bezala pasa duten denbora neurtu da modu honetan.

Puxtarrien testa

Puxtarrien testa sagu batek 15 minututan 20 puxtarririk zenbat lurperatzen dituen zenbatzean datza. Kaiola garbietan 4 cm-ko sakonera duen zerrauts-geruza batean beirazko 20 puxtarrri jarri dira, sagua bertan utzi eta 15 minutu beranduago, sagua kentzean, zenbat puxtarrri lurperatu dituzten zenbatu da (Deacon, 2006).

2. KAPITULUA



8. IRUDIA. Puxtarriak proba hasi aurretik eta ondoren.

Estatistika eta berreskuratze-maila

Graphpad Prism 6 erabili da estatistikako analisietarako. *Outlier* balioak kentzeko Graphpad-en *Outliers Calculator* onlineko aplikazioa erabili da eta esangura-maila $\alpha = 0,05$ -ean ezarri da (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Ondoren, aldagaien distribuzioa aztertu da D'Agostino eta Pearson-en normalitate testa erabilia eta honela, distribuzio parametrikoa duten aldagaietan t test ez-binakatuarekin alderatu dira emaitzak eta distribuzio ez-parametrikoa dutenekin Mann-Whitney testa erabili da ezberdintasunak estatistikoki esanguratsuak diren edo ez jakiteko. Konparazioak binaka egin dira, hots, batetik sagu kontrolen eta tratatu gabeko mdx sagu gaixoen datuak alderatu dira, eta bestetik tratatu gabeko mdx saguak eta tratatutakoak.

Berreskuratze-mailaren ehunekoa ondorengo formula erabiliz kalkulatu da (Gillis & Carlson, 2008):

$$\text{Berreskuratze mailaren ehunekoa} = \frac{\text{mdx tratatuak} - \text{mdx tratatu gabeak}}{\text{kontrolak} - \text{mdx tratatu gabeak}} \times 100$$

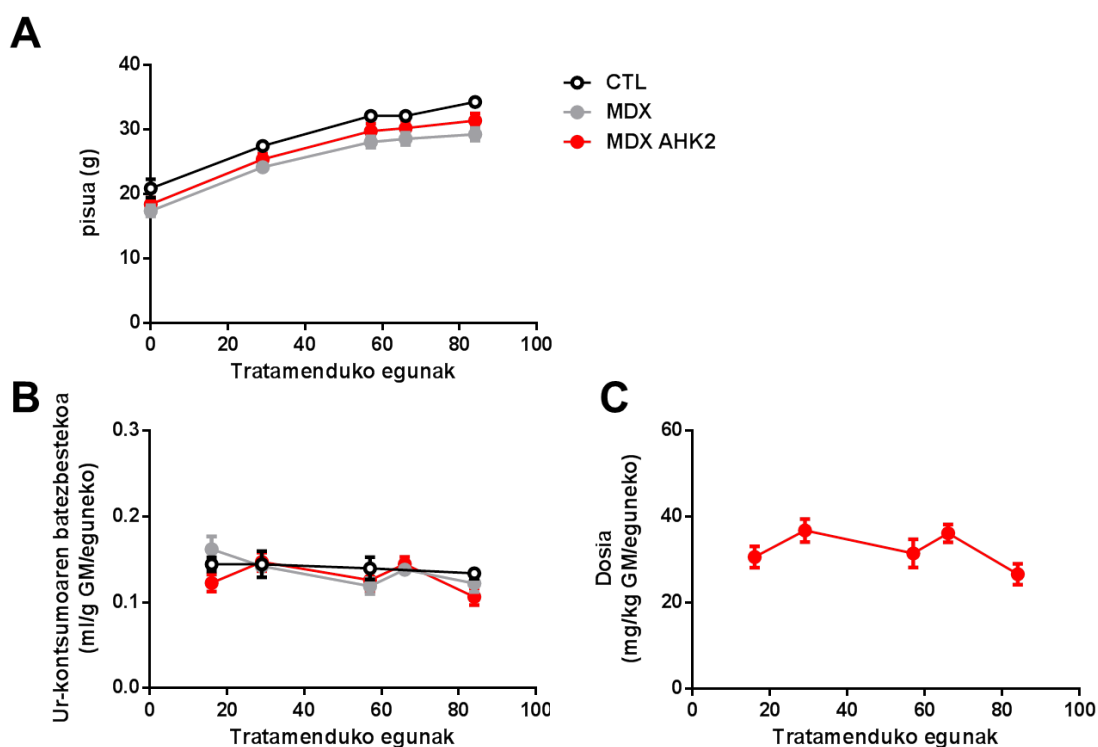
Datuen distribuzioa ez-parametrikoa denean ez da zuzena batezbesteko matematikoa erabiltzea, mediana erabiltzea litzateke egokiena. Dena den, batezbestekoa edo media

eta mediana artean % 5eko desberdintasuna baino gutxiago dagoenean, batezbestekoa erabili da, besteak beste berreskuratze-maila kalkulatzeko.

EMAITZAK

Animalien pisua, ur-kontsumoa eta dosiak

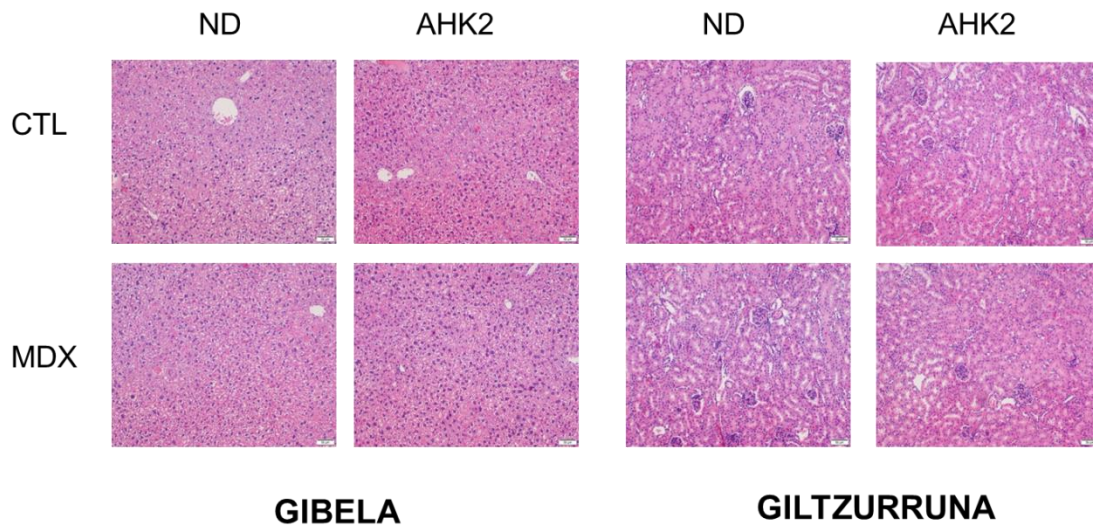
Saguen pisua eta ur-kontsumoaren jarraipena egin da saiakuntzan zehar. Jasotako datuei esker saguek hartu duten gutxi gorabeherako dosia kalkulatu da. Tratatu gabeko mdx saguen pisua zertxobait baxuagoa da beste bi taldeekin alderatuta nahiz eta aldaketa hauek ez diren estatistikoki esanguratsuak izan. Ur-kontsumoari dagokionez ez da aldaketarik atzeman hiru taldeen artean. Eta datu hauekin kalkulatu den dosia 25-35 mg AHK2/kg GM (gorputz-masa)/ egunekoa izan da. Datu hauek guztiak 9. irudian (A, B eta C) ikusi daitezke.



9.IRUDIA. Saguen pisua eta ur-kontsumoaren bilakaera eta administratutako AHK2 dosiak 12 asteko tratamenduaren ondoren. **(A)** Pisuaren bilakaeraren batezbestekoa tratamenduak iraun duen artean. **(B)** Ur-kontsumoaren batezbestekoa eguneko gorputz-masarekin normalizatuta tratamenduak iraun duen bitartean. **(C)** Jaso duten dosiaren batezbestekoa tratamenduak iraun duen bitartean. Datuak batezbestekoa \pm SEM gisa irudikatu dira; $n = 5$ CTL, $n = 15$ MDX eta $n = 15$ MDX AHK2.

AHK2aren toxikotasuna

Ez dira tratamenduak eragindako lesioak antzeman aztertutako gibel eta giltzurrun laginetan eta ez da inolako ezberdintasunik ikusi 12 astez 0,25 mg/ml AHK2 dosiarekin tratatutako eta tratatu gabeko sagu kontrol eta mdx saguetan (10. IRUDIA).



10. IRUDIA. Toxikotasuna aztertzeko H&E tindaketak gibel eta giltzurruneko ebakietan. Irudi adierazgarriak hautatu dira; n = 3 lagin taldeko aztertu dira guztira; eskala 50 μ m.

Oro har, 30 mg/kg GM/eguneko AHK2 dosiaren toxikotasun eza eta saguen eboluzio normala ikusita, pisuaren eta ur-kontsumoaren jarraipena egin ondoren, saguek AHK2 dosi hau ongi toleratzen dutela ondorioztatu da, baita tratamendu kronikoetan ere.

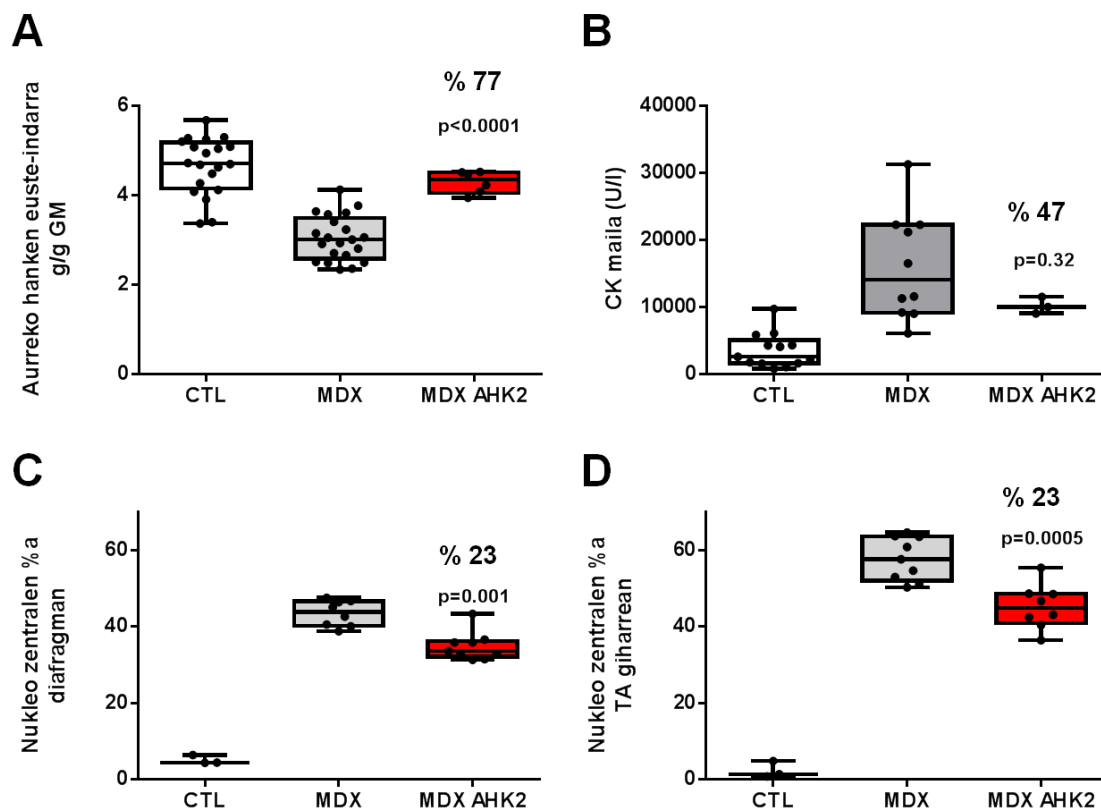
Funtzio muskularra

Aurrez laborategian lortutako emaitzak

Laborategian aurrez lortutako emaitzetan AHK2ak 5 asteko tratamenduaren ondoren mdx saguen defizit muskularrak modu esanguratsuan hobetzen dituela ikusi da (Aldanondo, 2017). 11. irudian ikusi daitekeen moduan, 2 hilabeteko mdx saguek % 35eko murrizketa dute aurreko hanken euste-indarrean, eta AHK2aren tratamenduak euste-indarra % 77an berreskuratzen du (11. IRUDIA, A). Gainera, mdx saguek emendatuta duten CK maila jaisteko joera nabarmena eragiten du AHK2ak % 47ko berreskuratze-mailarekin (11. IRUDIA, B). Lerro honi jarraituz, AHK2ak diafragma zein TA

2. KAPITULUA

giharreko nukleo zentralen ehunekoan beherakada adierazgarria ekarri du, bi kasuetan % 23ko berreskuratze-mailarekin (11. IRUDIA, C eta D).

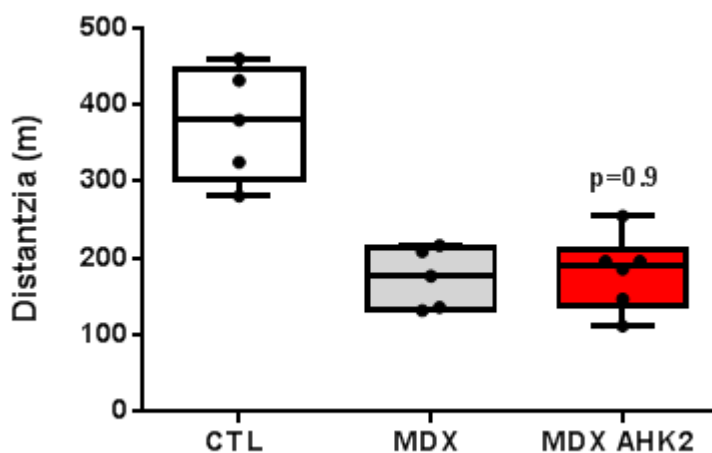


11. IRUDIA. 5 astez mdx saguak AHK2arekin tratatu ondoren aurrez taldean lortu diren emaitzak Whisker kaxa-diagrama bidez adierazita (Aldanondo, 2017). **(A)** Aurreko hanken euste-indarra. $n = 20$ CTL, $n = 21$ MDX eta $n = 8$ MDX AHK2; % 77ko berreskuratze-maila; CTL vs MDX $p < 0,0001$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,09$, MDX vs MDX AHK2 $p < 0,0001$ (Mann-Whitney testa eta t test ez-binakatua). **(B)** Serumeko CK maila. $n = 13$ CTL, $n = 10$ MDX eta $n = 3$ MDX AHK2; % 47ko berreskuratze-maila; CTL vs MDX $p < 0,0001$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,007$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,32$ (Mann-Whitney testa eta t test ez-binakatua). **(C)** Diafragmen azterketa histologikoa: nukleo zentralen ehunekoa. $n = 3$ CTL, $n = 9$ MDX eta $n = 10$ MDX AHK2; % 23ko berreskuratze-maila; CTL vs MDX $p = 0,01$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,009$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,001$ (Mann-Whitney testa). **(D)** TA giharren azterketa histologikoa: nukleo zentralen ehunekoa. $n = 3$ CTL, $n = 9$ MDX eta $n = 8$ MDX AHK2; % 23ko berreskuratze-maila; CTL vs MDX $p = 0,009$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,01$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,0005$ (Mann-Whitney testa eta t test ez-binakatua).

Ondoren azalduko diren probetan emaitza hauek 12 asteko iraupeneko tratamendu luzeagoen ondorioz mantentzen diren edo ez jakin nahi da. Patologiak aurrera egin ahala AHK2aren efikazia mantentzen den edo ez ikertu nahi da hain zuzen.

Neke-proba

Funtzio neuromuskularra neurtzeko proba hau korrika egiteko zinta erabiliz egin da, eta saguek nekatzeraino egindako distantzia totalaren balioa konparatu da. Sagu kontrolak eta mdx saguak, tratatu gabekoak zein tratatutakoak, konparatzean estatistikoki desberdintasun esanguratsuak lortu dira. Sagu kontrolek mdx sagu gaixoei baino korrika gehiago egin dutela ikusi da, 2,16 aldiz gehiago hain zuzen (CTL $375,6 \pm 33,0$ m vs MDX $174,2 \pm 17,7$ m) eta 0,25 mg/ml AHK2aren tratamenduak ez du aldaketarik eragin mdx saguak nekatu arte ibilitako distantzian ($182,0 \pm 19,9$ m).



12. IRUDIA. Saguek nekatu arte egin duten distantzia. Datuak Whisker kaxa-diagrama bidez adierazi dira; $n = 5$ CTL, $n = 5$ MDX, $n = 6$ MDX AHK2; CTL vs MDX $p = 0,008$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,004$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,9$ (Mann-Whitney testa).

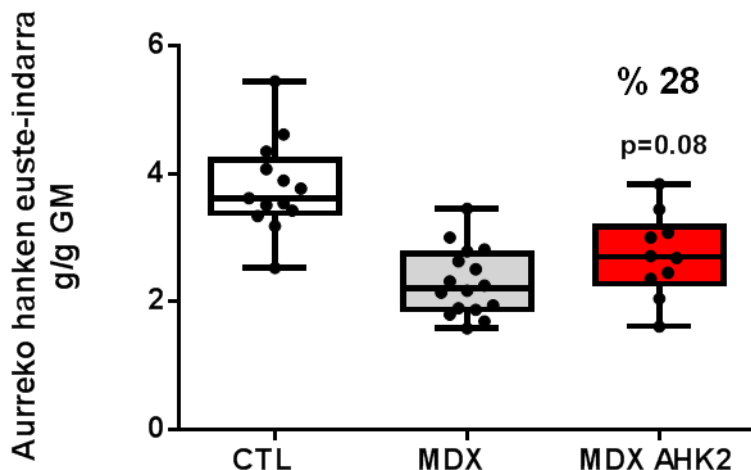
Laburbilduz, sagu kontrolek mdx saguei baino korrika gehiago egin dutela ikusi da eta AHK2arekin egindako tratamenduak ez du eraginik izan mdx saguak nekatu arte ibilitako distantzian. Aipatzekoa da ARM210 konposatuarekin, hau da, RyR-kalstabina lotura egonkortzailearekin, egindako lanetan ere ez zutela hobekuntzarik ikusi saguak nekatu arte ibilitako distantzian (Capogrosso et al., 2018).

Euste-indarraren neurketa

Aurreko hanken euste-indarra neurtzea da literaturan orain arte gehien erabili den probetako bat terapia zein tratamendu ezberdinen efektua aztertzeko (Aartsma-Rus & van Putten, 2014; Luca, 2008). Mdx saguek sagu kontrolek baino euste-indar baxuagoa dutela ikusi da aurreko hanketan 4 hilabeteko adinarekin, hau da, 12 asteko *in vivo*aren

2. KAPITULUA

ostean % 39 indar gutxiago dute sagu gaixoeak (2 hilabeterekin % 35eko indar jaitsiera ikusi zen, 11. IRUDIA). AHK2a edarian izan duten mdx saguek % 28ko berreskuratze maila dute; dena den, tratamenduak ez du estatistikoki ezberdintasun nabarmenik eragin (CTL $3,79 \pm 0,20$ g/g GM, MDX $2,3 \pm 0,13$ g/g GM eta $2,72 \pm 0,21$ g/g GM MDX AHK2) (12.IRUDIA).



13. IRUDIA. Saguen aurreko hanken euste-indarra. Datuak Whisker kaxa-diagrama bidez adierazi dira; n = 13 CTL, n = 16 MDX, n = 10 MDX AHK2; AHK2arekin % 28ko berreskuratze-maila; CTL vs MDX $p < 0,0001$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,001$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,08$ (t test ez-binakatu).

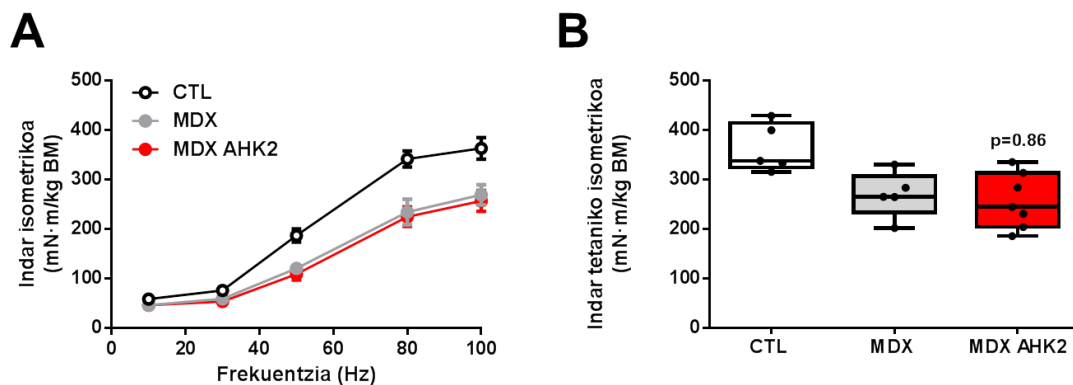
Emaitza hauek adierazten dute aurreko hanken euste-indarrari dagokionez AHK2arekin lortzen den hobekuntza gaixotasunak aurrera egin ahala gutxituz doala; 5 asteko tratamenduarekin 2 hilabeteko saguetan % 77ko berreskuratze-maila lortu zen, 12 astez tratatu ondoren 4 hilabeteko saguek lortutako % 28koaren aurka.

Oin-zolako gihar flexoreen indarraren neurketa in vivo

Aurreko probak nahiko subjektiboak izan daitezke, euste-indarraren kasuan esperimendatzaileak berak inkontzienteki indar gehiago egin dezake, eta neke-proban ere irizpideak norberak jartzen dituzenez, objektiboki lan egitea zaila gerta liteke. SOPetan proba hauetako emaitzak beste test batzuekin baieztatzea aholkatzen dute. Honela, ondoren egin diren frogak objektiboagoak dira, emaitzak aparatu batzuen baitan lortu direlako, eta ez esperimendatzailearen baitan. Oin-zolako gihar flexoreen indarra *in vivo*

eta diafragma zati baten indarra *in vitro* (hurrengo atalean) Aurora 3 in 1 aparatuan neurtu dira, besteak beste.

Aurora 3 in 1 aparatuan ezker oin-zolako gihar flexoreen indarra neurtu da lehendabizi saguak lokartuta zeudela. Indar-frekuentziaren erlazioa erregistratzeko probatik indar tetaniko maximoa 100 Hz-ra kalkulatu da, frekuentzia horretan iritsi dira eta indar balio altuenetara. Espero bezala, indar tetaniko isometrikoa baxuagoak izan da mdx saguetan kontrolekin alderatuta. Baina ez da hobekuntzarik lortu indar isometriko tetanikoan 0,25 mg/ml AHK2 tratamenduarekin. Honakoak izan dira indar tetaniko isometrikoak: CTL $363,4 \pm 21,8$ mN·m/kg, MDX $269,2 \pm 20,7$ mN·m/kg eta MDX AHK2 $257,0 \pm 21,2$ mN·m/kg.



14. IRUDIA. Oin-zolako gihar flexoreen indarra *in vivo*. **(A)** Indar-frekuentzia erlazioa eta **(B)** indar tetaniko isometriko maximoa. Datuak batezbestekoa \pm SEM gisa irudikatu dira (A)-n eta Whisker kaxa-diagrama gisa (B)-n; n = 5 CTL, n = 6 MDX, n = 7 MDX AHK2; CTL vs MDX p = 0,02, CTL vs MDX AHK2 p = 0,01, MDX vs MDX AHK2 p = 0,86 (Mann-Whitney testa).

Honela, ondorioztatu daiteke AHK2ak ez duela oin-zolako gihar flexoreen indarra berreskuratzen laguntzen mdx saguetan.

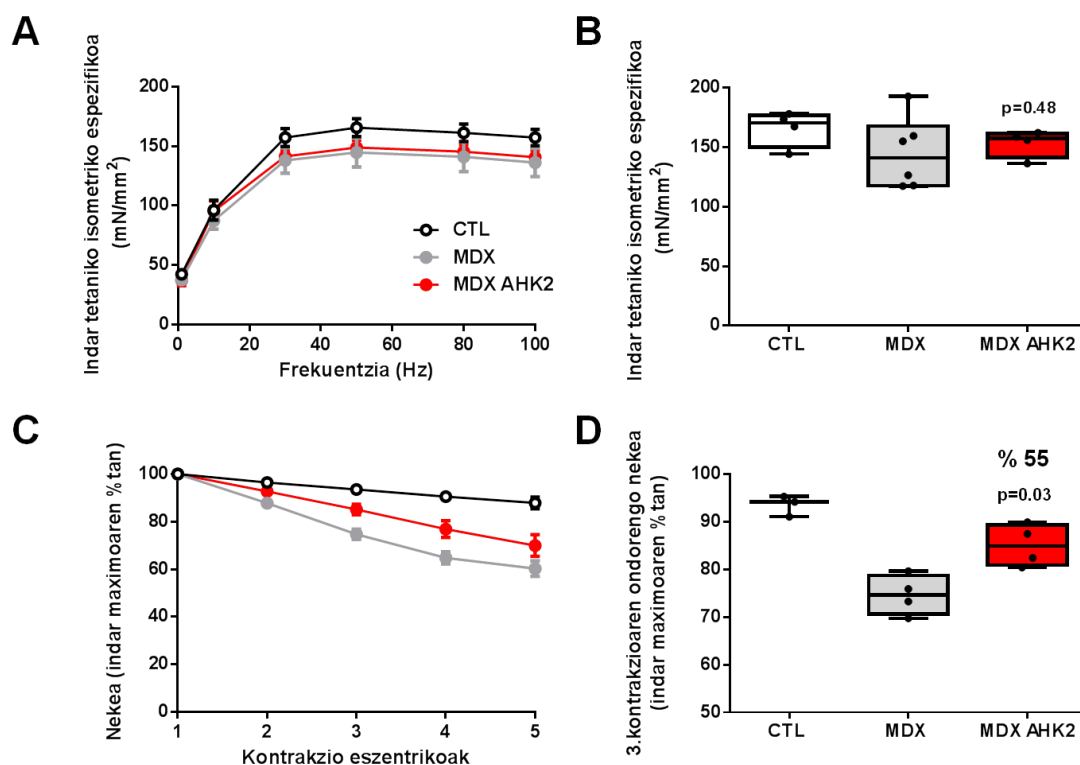
Diafragmaren indarraren neurketa in vitro

Ondoren, diafragma erazi eta ezkerraldeko saiheits-hezur eta erdiko tendoiaren arteko gihar zati laukizuzen baten indarra neurtu da *in vitro* Aurora 3 in 1 aparatua erabilia.

12 asteko tratamenduaren ostean, indar espezifikoak neurtzerakoan ez dira desberdintasunak ikusi kontrolen diafragmak mdx saguenekin alderatzean. Hauek izan dira indar tetaniko isometriko espezifikoak: CTL $165,6 \pm 7,5$ mN·mm², MDX $144,7 \pm 12,1$ mN·mm² eta MDX AHK2 $153,2 \pm 5,8$ mN·mm² (15. IRUDIA, B).

2. KAPITULUA

Diafragma kontrakzio eszentrikoak burutzeraz behartzean, ordea, mdx saguen giharrek okerrago erantzun dute, bost kontrakzio eta gero indarraren % 40a galdu dute, kontrolek soilik % 12 galdu dutenean. Hirugarren kontrakzio eszentrikoan AHK2arekin lortutako hobekuntza estatistikoki adierazgarria izan da, % 55eko berreskuratze-mailarekin (15. IRUDIA, C eta D). 4. eta 5. kontrakzioaren ondoren ere joera berdina mantendu da, % 47 eta % 35 berreskuratze-mailarekin, baina hobekuntza hauek ez dira esanguratsuak izan estatistika aldetik (15. IRUDIA, C).



15. IRUDIA. Erauzitako diafragmaren indarra *in vitro*. (A) Indar-frekuentzia erlazioa, (B) indar tetaniko isometriko maximoa, (C) kontrakzio eszentrikoak sortutako nekea edo indar galera ehunekotan eta (D) 3. kontrakzio eszentrikoaren ondorengo nekea edo indar galera ehunekotan, AHK2arekin % 55eko berreskuratzea lortu da. Datuak batezbestekoa \pm SEM gisa irudikatu dira (A) eta (C)-n eta Whisker kaxa-diagrama bidez (B) eta (D)-n; $n = 4$ CTL, $n = 6$ MDX eta $n = 4$ MDX; (B)-n CTL vs MDX $p = 0,26$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,2$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,48$; (D)-n CTL vs MDX $p = 0,057$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,057$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,0286$; (Mann-Whitney testa).

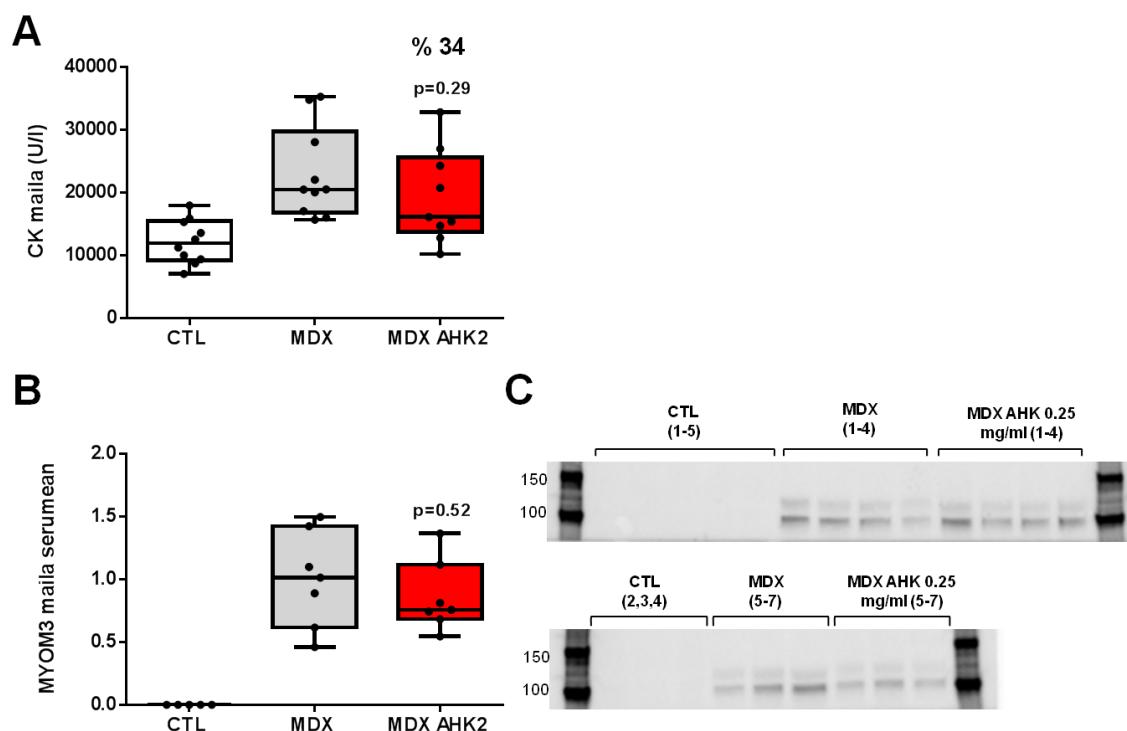
Beraz, batetik, *in vitro* neurtutako diafragmen indarrean ez da desberdintasunik ikusi kontrakzio isometrikoak eginaraztean sagu kontrol eta mdx saguen artean. Hau ikusita, ez da harrizkoa tratamenduarekin ere aldaketarik ez somatzea. Bestetik, kontrakzio eszentrikoek mdx saguen diafragmetan indar galera handiagoa dakartela ikusi da kontrolekin alderatuta, literaturan deskribatuta dagoen bezala (Olthoff et al., 2018), eta

AHK2a muskulu distrofikoak babesteko gai dela baieztatu da kontrakzio eszentrikoak sortzen dien kaltetik.

Giharretako kaltea neurtzeko serumeko markatzaile biologikoen detekzioa

Laginak burua moztu eta zuzenean lepotik ateratako odola jasota eskuratu dira. Modu honetara lagin gehienak ez dira hemolizatu eta lortutako baliok fidagarritzat jo dira. Mdx saguen serumean CK maila altuagoa da 1,89 aldiz kontrolekin alderatuta (CTL 12167 ± 1109 U/l vs MDX 22992 ± 2298 U/l), eta 0,25 mg/ml AHK2arekin tratatutako mdx saguek % 34ko berreskuratze-maila dute (19338 ± 2472 U/l), nahiz eta estatistika kontuan izanda ez diren ezberdintasun adierazgarriak lortu.

Giharretako kaltearen beste adierazle bat serumean aurki daitekeen MYOM3 proteina-maila da, proteina honek giharretako miozuntzekatan funtzio estrukturala du (Rouillon et al., 2015) eta kaltetutako giharretan soilik ateratzen da serumera. Kasu honetan, espero bezala, sagu kontroletan ez da miomesinarik detektatu eta mdx saguetan, aldiz, deskribatuta dauden miomesinaren bi zatiak (100 eta 130 KDa-ekoak) ikusi dira. Dena den, AHK2arekin ez da proteina honen jaitsiera nabarmenik antzeman.



16. IRUDIA. Serumeko gihar-kaltearen markatzaileak. **(A)** CK maila. Datuak Whisker kaxa-diagrama bidez irudikatu dira; $n = 10$ CTL, $n = 10$ MDX eta $n = 9$ MDX AHK2; % 34ko berreskuratze-maila; CTL vs MDX $p = 0,0005$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,01$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,29$ (t test ez-binakatua). **(B)** MYOM3 proteina-mailaren kuantifikazioa mdx saguen batez

2. KAPITULUA

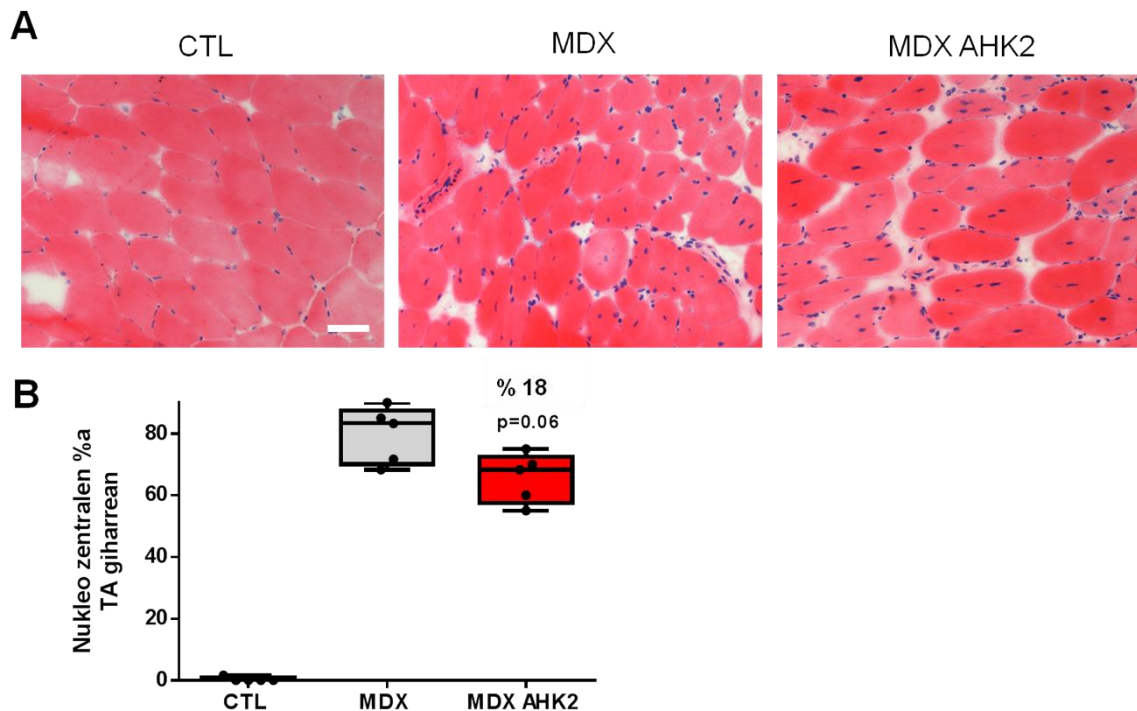
besteko balioarekin normalizatuta. $n = 5$ CTL, $n = 7$ MDX, $n = 7$ MDX AHK2; CTL vs MDX $p = 0,002$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,002$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,52$ (Mann-Whitney testa). (C) Western Bloteko irudiak.

Emitza hauek kontuan izanik, sagu kontrol eta mdx saguen artean serumeko CK mailan dauden ezberdintasunak txikiagoak dira *in vivo* honetan 5 astekoarekin alderatzean. Laginen artean aldakortasun handia ageri da eta honek lagin kopurua handitzea eskatzen du potentzia estatistikoa lortu ahal izateko. Hala eta guztiz ere, AHK2ak CK maila jaisteko joera du 12 asteko tratamenduaren ondoren, 5 asteko tratamenduetan ikusi zen bezala. Miomesinari dagokionez, sagu kontrolak mdx saguengatik bereizteko markatzaile egokia da, kontrolek ez baitute proteina honen arrastorik serumean; dena den, ez dirudi farmako baten eraginkortasuna neurtzeko markatzaile edo test egokia denik, mdx saguek euren artean duten aldakortasuna CK mailarena baino handiagoa baita.

Giharren azterketa histologikoa

H&E tindaketarekin *tibialis anterior* giharren eta diafragmaren histologia aztertu da AHK2ak eraginik ba ote duen ezagutzeko. Tratatu gabe zein AHK2arekin tratatutako mdx saguen TA giharrek eta diafragmek ezaugarri distrofiko tipikoak dituzte, hala nola, gihar-zuntzen arkitektura aldatua, nekrosia, infiltrazioak, gihar-zuntzen diametroan aldakortasuna eta nukleo zentralen presentzia, 17. eta 18. irudian ikusi daitekeen bezala. Gihar-zuntzen nukleo zentralen ehuneko kuantifikatu da, nukleoaren kokapen zentrala giharretako zelulen endekapen-birsortze prozesuaren markatzailea da, izan ere kalterik gabeko gihar-zuntz helduek nukleoa periferian izan ohi dute.

Batetik, TA giharren nukleo zentralak zenbatu dira: sagu kontrolen gihar-zuntzen % $0,3 \pm 0,3$ du nukleo zentrala, mdx saguetan % $79,7 \pm 4,1$ ek eta AHK2arekin tratatutako mdx saguetan % $64,7 \pm 3,6$ k. AHK2ak eragindako nukleo zentralak dituzten gihar-zuntzen murrizketa honek % 18ko berreskuratze-maila dakar (17. IRUDIA).

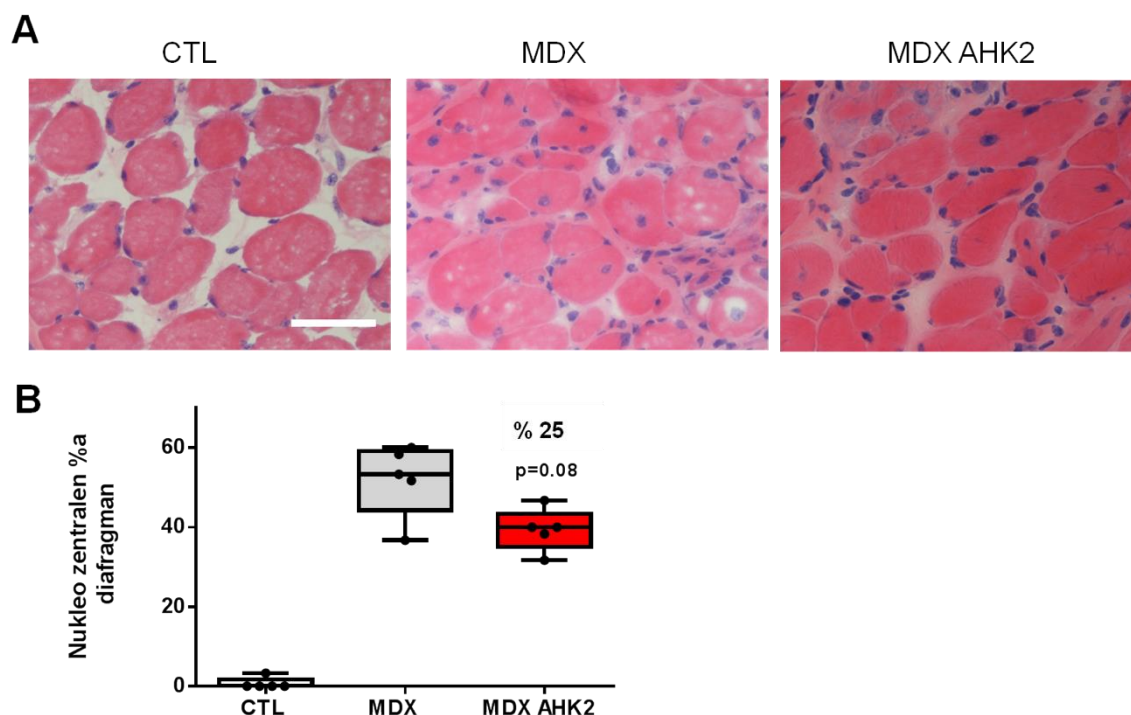


17.IRUDIA. *Tibialis anterior* giharren azterketa histologikoa. **(A)** Sagu kontrol, mdx eta AHK2arekin tratatutako mdx saguen TA giharren kriostato-sekzio adierazgarriak H&E tindaketaren ondoren. Eskala 50 μ m. **(B)** Nukleo zentralen zenbaketa %tan. Datuak Whisker kaxa-diagraman irudikatu dira; n = 5 CTL, n = 5 MDX eta n = 5 MDX AHK2; %18ko berreskuratze-maila; CTL vs MDX p = 0,008 , CTL vs MDX AHK2 p = 0,008 , MDX vs MDX AHK2 p = 0,06 (Mann-Whitney testa).

Emitza hauek adierazten dute mdx saguetan TA giharreko nukleo-zentralen ehunekoak gora egiten duela denborarekin, batez beste % 60ak du nukleo zentrala 2 hilabeteko saguetan eta % 80ak 4 hilabeteko saguetan. 12 asteko AHK2 tratamenduaren ondoren *tibialis anterior* giharren histopatologian hobekuntzak jarraitzen duela ikusi da, baina 5 asteko tratamenduarekin alderatuta zertxobait jaitsi da berreskuratze-maila (% 23tik % 18ra). Proba honek lotura zuzena du aurrez azaldu den hanken euste-indarrarekin (13. IRUDIA), kasu honetan ere hobekuntzarako joera argia ikusi da, baina estatistikoki ez da aldaketa esanguratsurik lortu.

Bestetik, diafragmak ere aztertu dira: kontrolen gihar-zuntzen % $0,7 \pm 0,7$ k du nukleo zentrala, mdx saguetan % $52,0 \pm 4,1$ ek eta AHK2arekin tratatutako mdx saguetan % $39,3 \pm 2,4$ k. Kasu honetan, AHK2ak % 25eko berreskuratze-maila dakar (18. IRUDIA).

2. KAPITULUA



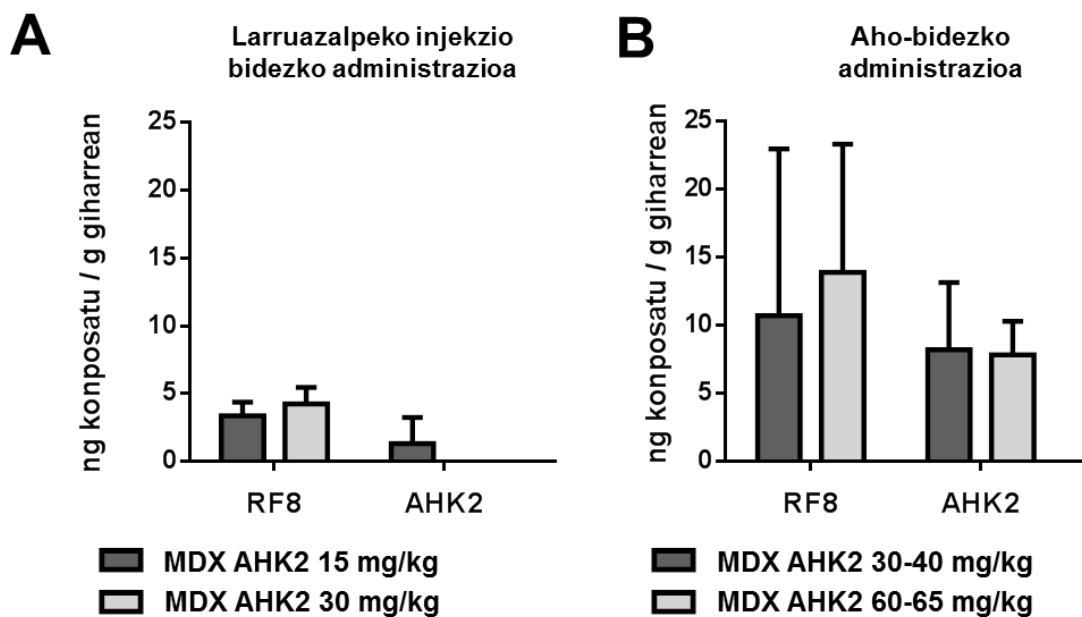
18.IRUDIA. Diafragmen azterketa histologikoa. **(A)** Sagu kontrol, mdx eta AHK2arekin tratatutako mdx saguen diafragmaren kriostato-sekzio adierazgarriak H&E tindaketaren ondoren. Eskala 50 μ m. **(B)** Nukleo zentralen zenbaketa %tan. Datuak Whisker kaxa-diagraman irudikatu dira; n = 5 CTL, n = 5 MDX eta n = 5 MDX AHK2; % 25eko berreskuratze-maila; CTL vs MDX p = 0,008, CTL vs MDX AHK2 p = 0,008, MDX vs MDX AHK2 p = 0,08 (Mann-Whitney testa).

Kasu honetan 2 hilabeteko zein 4 hilabeteko mdx saguen diafragmen zeluletan zenbatutako nukleo zentralen ehunekoa antzekoa izan da. AHK2arekin 12 astez tratatu ondoren diafragmen histopatologian hobekuntzak ikusi dira eta gaixotasunaren estadio goiztiarragoa ikertzean lortutako berreskuratze-maila antzekoa erdietsi da (% 25ekoa lortu da orain, eta % 23koa lortu zen 5 asteko tratamenduaren ondoren), nahiz eta oraingo honetan estatistikoki ez den adierazgarria izan. Gainera, emaitza hauek bat egiten dute diafragmaren indarra neurtzeko *in vitro* lortutako emaitzekin, non AHK2aren administrazioak diafragma kontrakzio eszentrikoetatik babesten duela ikusi den mdx saguetan (15. IRUDIA, C eta D).

AHK2ren kontzentrazioa giharretan

AHK2a giharretara iristen dela ziurtatzeko kromatografia teknika konplexu baten bidez molekula honen zein honen metabolitoak diren RF6 eta RF8ren kontzentrazioa neurtu da tratatutako saguetan. Batetik, 8 egunez jarraian bi dosirekin injektatutako mdx sagu

batzuen VL giharrak aztertu dira. Lagin hauetan RF8 metabolitoa eta AHK2 molekula detektatu ahal izan dira, baina oso kontzentrazio baxuan, eta dosi bikoitzarekin ez da kontzentrazio bikoitza topatu (19. IRUDIA, A). Aipatzekoa da azken dosia injektatu eta 18 ordura eskuratu direla laginak. Bestetik, edarian AHK2a bost astez izan duten mdx sagu batzuen gastroknemio giharra aztertu da. Kasu honetan, aurrekoan baino RF8 eta AHK2 kontzentrazio altuagoak detektatu dira, baina aldakortasun handia dago. RF6 metabolitoaren traza batzuk baino ez dira antzeman, horregatik oso azkar metabolizatu eta desagertzen dela ondorioztatu da, metatu gabe.



19.IRUDIA. AHK2 molekularen eta RF8 metabolitoaren kontzentrazioak AHK2arekin tratatutako saguen giharretan. **(A)** VL giharraren azterketa AHK2a larruazalpeko injekzio bidez administratu eta 18 h beranduago. **(B)** Gastroknemio giharraren azterketa AHK2a aho bidez administratu eta gero. Datuak batezbestekoa \pm SEM gisa irudikatu dira; $n = 4$ taldeko.

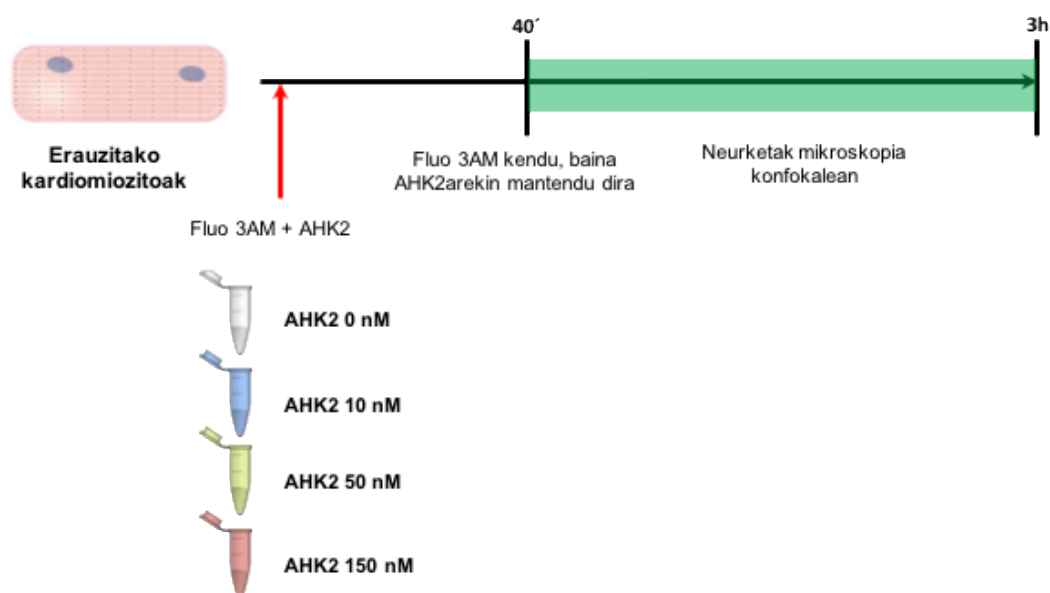
Emitza hauekin egiaztatu da AHK2a zein aktibitate farmazeutikoa izan dezaken RF8 metabolitoa giharretara heltzen direla. Detektatutako kontzentrazioan aldakortasun handiagoa ikusi da AHK2a aho bidez administratu zaien saguetan larruazalpeko injekzio bidezkoetan baino.

Funtzio kardiakoa

AHK2 tratamendu akutuaren efektua in vitro kardiomiozitoetan

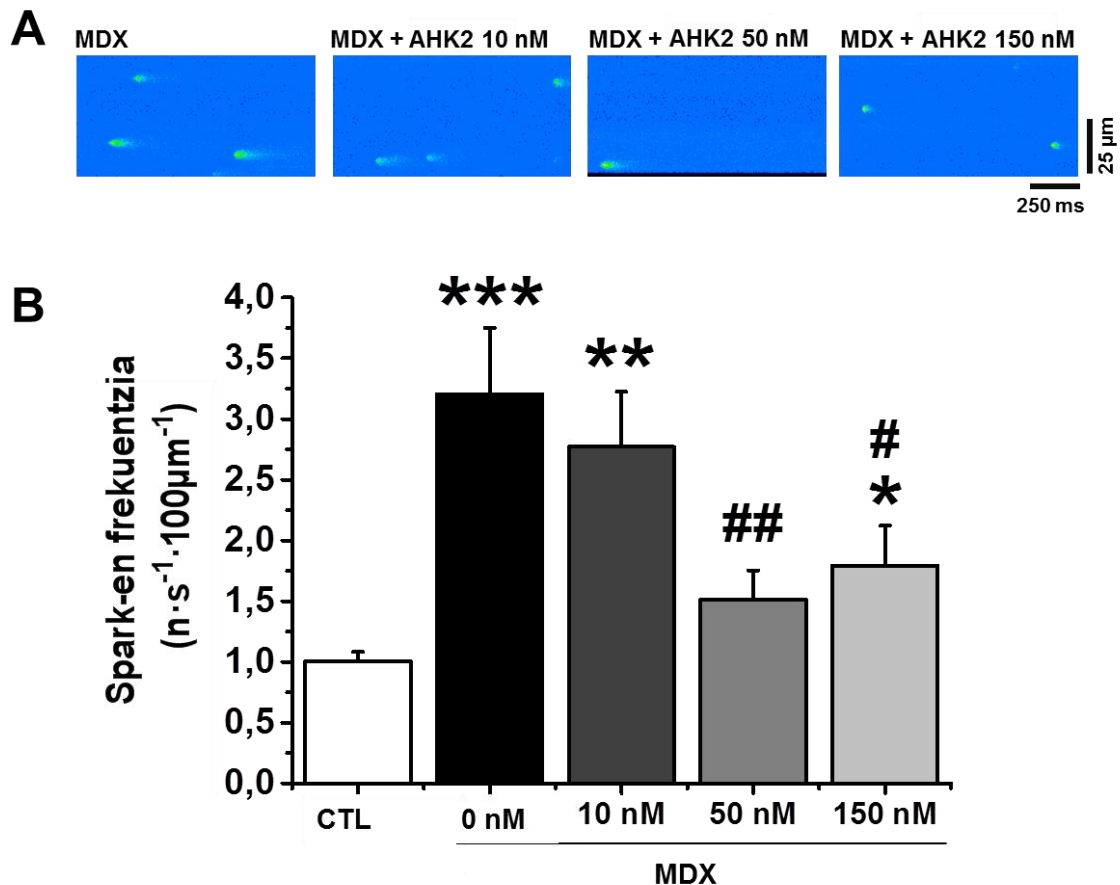
AHK2arekin 12 astez tratatu diren mdx saguen bihotzak aztertu aurretik froga bat egin da *in vitro* tratatutako mdx saguen kardiomiozito batzuetan.

Lehenik eta behin, AHK2ak *in vitro* kaltzioen *spark* edo txinpartetan duen eraginkortasuna aztertu nahi izan da, mdx saguen kardiomiozitoek kaltzio-txinparten frekuentzia altuagoa dutela deskribatuta baitago (Fauconnier et al., 2010). Horretarako mdx saguen kardiomiozitoak isolatu dira, eta, ondoren, *in vitro*, kaltzioa markatzen duen Fluo 3AM zundarekin batera hainbat AHK2 kontzentrazio probatu dira, 20. irudian ikusi daitekeen bezala. Honela, 40 minututik 3 ordura, gutxi gorabehera, izan dute AHK2aren tratamendu akutua.



20. IRUDIA. AHK2 kontzentrazio ezberdinekin *in vitro* tratatutako kardiomiozitoen diseinu esperimentalak.

21. irudian ikusi daitekeen moduan, AHK2arekin tratatutako mdx saguen kardiomiozitoek *spark* frekuentzia baxuagoa dute. Zehazki, 50 nM AHK2 kontzentrazioan lortu da emaitza hoberena, eta badirudi dosia handitzean, 150 nM, emaitza bere horretan mantentzen dela. Emaitza hauek guztiak 21. irudian adierazi dira.



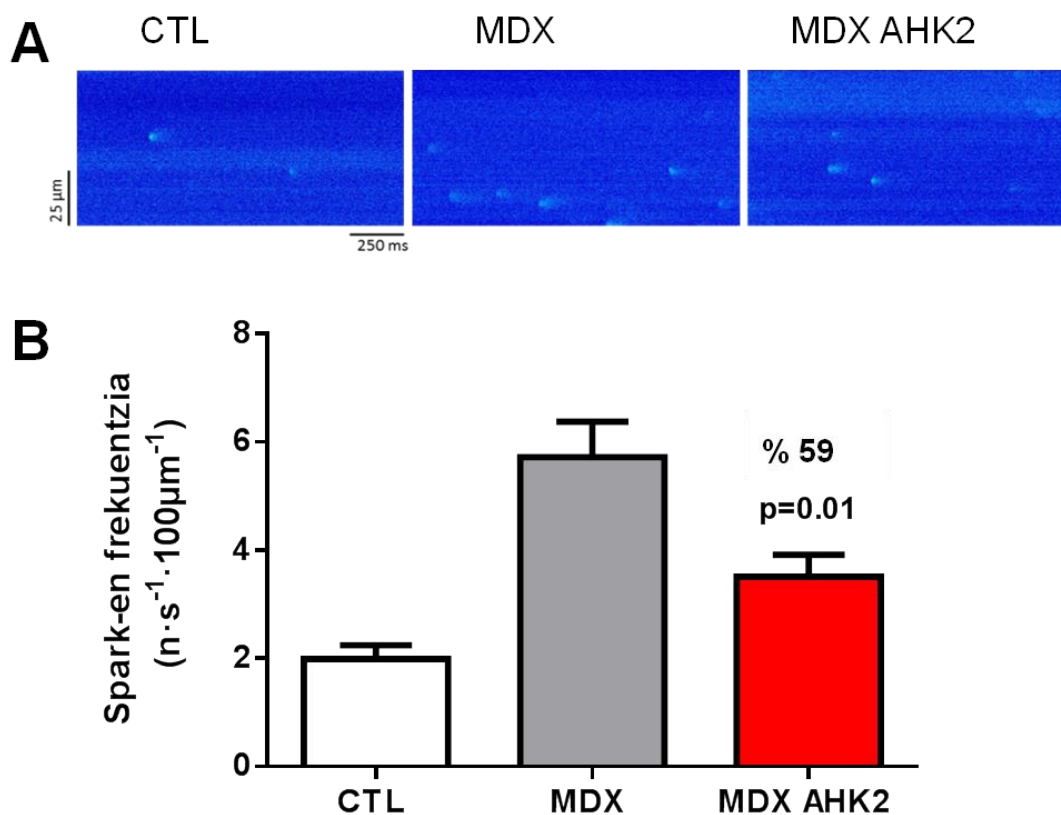
21. IRUDIA. AHK2 kontzentrazio ezberdinekin *in vitro* tratatutako kardiomiozitoen kaltzio-txinparten frekuentzia. **(A)** Kaltzio-txinparten irudi adierazgarriak MDX eta MDX AHK2 10 nM, 50 nM eta 150 nM kardiomiozitoetan. **(B)** Kaltzio-txinparta edo *spark*-en frekuentzia. Datuak batezbestekoa \pm SEM gisa irudikatu dira; $n = 79$ zelula CTL, $n = 26$ MDX 0 nM, $n = 22$ MDX AHK2 10 nM, $n = 20$ MDX AHK2 50 nM eta $n = 21$ MDX AHK2 150 nM; * vs CTL $P < 0.05$, ** vs CTL $P < 0.01$, *** vs CTL $P < 0.001$, # vs MDX $p < 0.05$, # vs MDX $p < 0.01$ (t test ez-binakatua).

AHK2 tratamendu kronikoaren efektua in vivo kardiomiozitoetan

In vitro lortutako emaitzak ikusirik, AHK2ak bihotzean duen efektua aztertzen jarraitu da, kasu honetan tratamendua aho bidez modu kronikoan 12 astez administratu eta gero. Sagu emeen bihotza aztertu da eta horretarako isolatutako kardiomiozitoetan kaltzioaren mugimendu zitოსolikoak neurtu dira. Batetik, estimulatu gabe, kaltzio-txinparten frekuentzia neurtu da diastolean, hau da, zelulak erlaxatuta daudela (22. IRUDIA). Espero bezala, mdx saguen kardiomiozitoek kaltzio-txinparta (*spark*) gehiago dituzte, 3 aldiz gehiago ia-ia, eta AHK2 tratamenduari esker *spark*en frekuentzia jaisten da, % 59ko

2. KAPITULUA

berreskuratze-mailarekin (CTL $1,99 \pm 0,25 \text{ n}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 100\mu\text{m}^{-1}$, MDX % $5,73 \pm 0,65 \text{ n}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 100\mu\text{m}^{-1}$ eta MDX AHK2 % $3,51 \pm 0,41 \text{ n}\cdot\text{s}^{-1}\cdot 100\mu\text{m}^{-1}$).

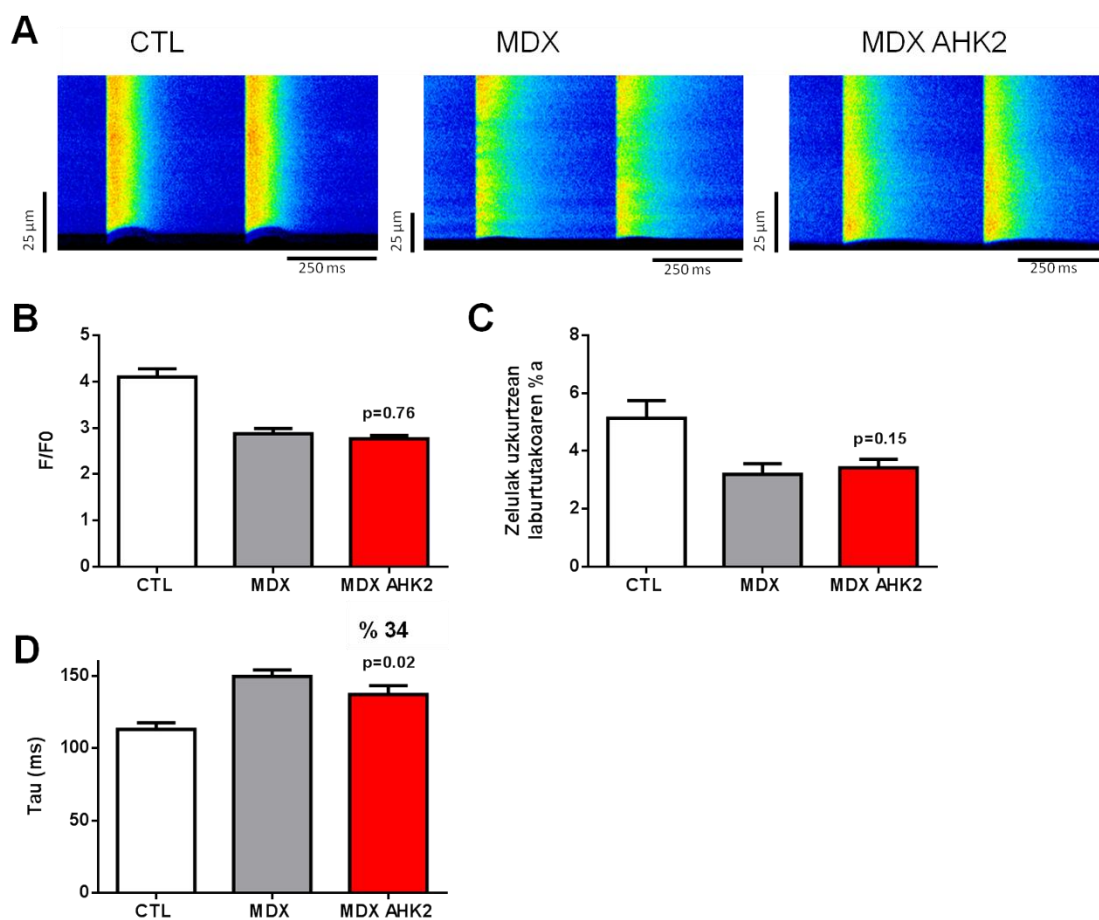


22. IRUDIA. Kaltzioaren mugimendu zitosolikoak diastolean dauden kardiomiozitoetan. (A) Kaltzio-txinparten irudi adierazgarriak CTL, MDX eta MDX AHK2 0,25 mg/ml kardiomiozitoetan. (B) Kaltzio-txinparta edo *spark*-en frekuentzia. Datuak batezbestekoa ± SEM gisa adierazi dira; n = 49 zelula CTL, n = 59 zelula MDX eta n = 60 zelula MDX AHK2; % 59ko berreskuratze-maila; CTL vs MDX p < 0,0001, CTL vs MDX AHK2 p = 0,006, MDX vs MDX AHK2 p = 0,011 (Mann-Whitney testa).

Esperimentu honekin aurreko atalean lortutako emaitzak berretsi dira, hau da, AHK2arekin *in vitro* eginiko tratamenduekin lortutako *spark*en frekuentziaren jaitsiera errepikatu da aho bidez 12 astetan AHK2a administratu zaien saguen kardiomiozitoetan ere.

Bestetik, zelulak elektrikoki estimulatu dira, uzkurdua sistolikoa simulatuz. Mdx saguen kardiomiozitoek erretikulutik kaltzio gutxiago askatzen dutela (F/F₀) ikusi da eta AHK2 molekulak ez du eraginik ioi honen liberazioan estimulu elektriko baten ondoren (F/F₀ ratioaren balioak honakoak izan dira: CTL $4,1 \pm 0,2$, MDX $2,9 \pm 0,1$ eta MDX AHK2 $2,8 \pm 0,1$). Estimulazio elektrikoaren ondorioz zelulak gehiago uzkurdu edo laburtzen dira

kontroletan mdx-etan baino, aldaketa hau ere esanguratsua da, eta AHK2 tratamenduak ez du hobekuntzarik sortu ("cell shortening" edo zelulen laburdura ehunekotan honakoa izan da: CTL % $5,1 \pm 0,6$, MDX % $3,2 \pm 0,4$ eta MDX AHK2 % $3,4 \pm 0,3$). Ca^{2+} -aren jaitsiera kurbatik Tau balioa eskuratu da. Honela, mdx kardiomiotoen Tau-a % 32 altuagoa dela ikusi da kontrolekin konparatuta eta AHK2ak balio hau murrizten duela atzeman da % 34ko berreskuratze-mailarekin, beraz, badirudi SERCA bidezko kaltzioaren birjasotzean eragin zuzena duela AHK2 molekulak (Tau: CTL % $113,2 \pm 4,5$ ms, MDX % $149,6 \pm 4,6$ ms eta MDX AHK2 % $137,3 \pm 6,1$ ms). Emaizta hauek 23. irudian daude ikusgai.



23. IRUDIA. Kaltzioaren mugimendu zitosolikoak sistolean dauden kardiomiotoetan. (A) Kaltzioaren trantsitorioen irudi adierazgarriak CTL, MDX eta MDX AHK2 0,25 mg/ml kardiomiotoetan. (B) F/F0 ratioa. (C) Zelulak uzkuertzean laburtu direnaren ehunekoa. (D) Kaltzioaren jaitsiera kurbaren adierazle den Tau balioa, AHK2arekin %34ko berreskuratze-maila lortu da. Datuak batezbestekoa \pm SEM gisa adierazi dira; n = 49 zelula CTL, n = 59 zelula MDX eta n = 60 zelula MDX AHK2; (B)-n CTL vs MDX p < 0,0001, CTL vs MDX AHK2 p < 0,0001, MDX vs MDX AHK2 p = 0,76, (C)-n CTL vs MDX p = 0,046, CTL vs MDX AHK2 p = 0,2, MDX vs

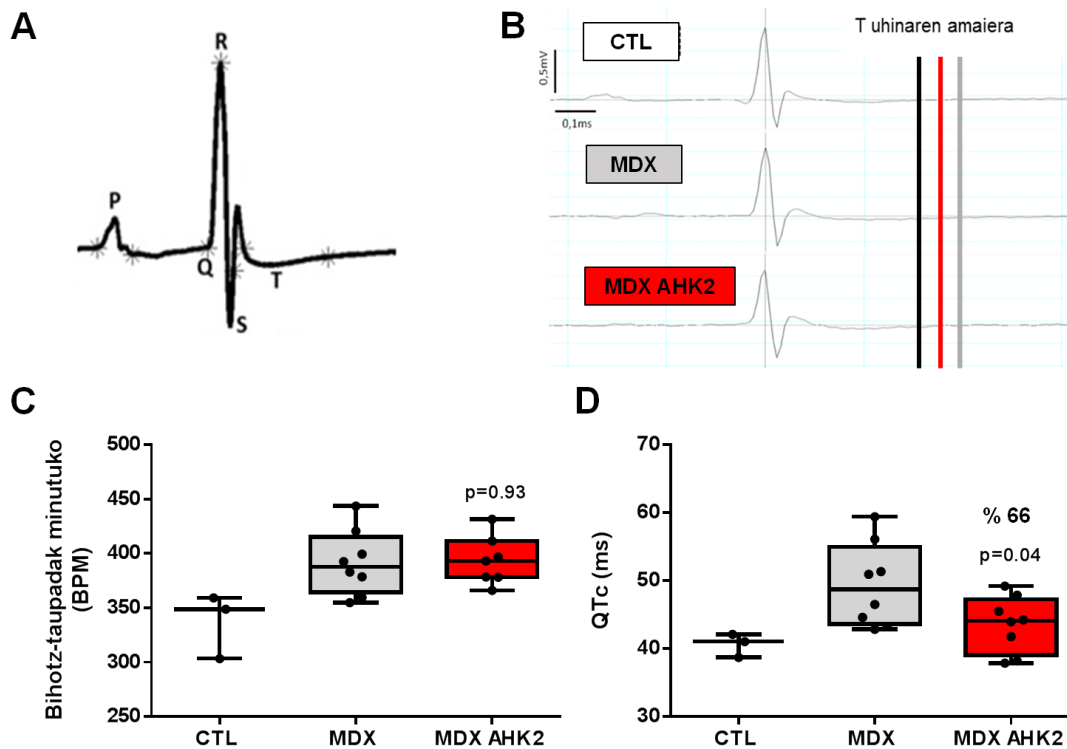
2. KAPITULUA

MDX AHK2 $p = 0,15$ eta (D)-n CTL vs MDX $p < 0,0001$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,001$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,02$ (Mann-Whitney testa).

F/F0 ratioaren bidez estimulu baten ondoren erretikulu sarkoplasmikotik atera eta sartu den kaltzioaren arteko erlazioa aztertu da. Ratio hau baxuagoa da mdx saguetan eta ez da berreskuratu AHK2arekin. RyR2 kaltzio-kanala iragazkorra dela deskribatu da mdx saguetan (Fauconnier et al., 2010), kaltzioa kontrolik gabe atera daitekeela, alegia, homeostasia desegonkortuz, eta hau izan daiteke kardiomiozitoek estimulu elektrikoaren ondoren erretikulutik kaltzio gutxiago askatzearen arrazoia. Gainera, kardiomiozitoak estimulatzean uzkurtu egiten dira, eta mikroskopia konfokalean hartzen diren irudiekin zelulak zenbat laburtzen diren neurtu daiteke. Kontrolen zelulekin alderatuta mdx saguen kardiomiozitoak gutxiago laburtzen direla ikusi da, eta kasu honetan ere AHK2arekin ez da hobekuntzarik atzeman. Aitzitik, Tau edo kaltzio jaitsieraren malda aztertzerakoan, mdx saguen zelulek kaltzioa erretikulu sarkoplasmikora birkaptatzeko denbora gehiago behar dutela ikusi da eta AHK2ak denbora hau laburtzen duela agerian gelditu da.

Elektrokardiograma (EKG)

Saguak sakrifikatu aurretik elektrokardiograma bidez bihotzaren funtzioa aztertu da. Bihotz-taupaden frekuentzia altuagoa da mdx saguetan kontrolekin alderatuta, eta AHK2 tratamenduak ez du eraginik (CTL 337 ± 17 taupada/min, MDX 392 ± 11 taupada/min eta MDX AHK2 394 ± 8 taupada/min). QTc tarte, taupada baten ondoren bihotzak birpolarizatzeko behar duen denbora, luzeagoa da mdx saguetan eta AHK2arekin tarte hau laburtzea lortu da modu esanguratsuan % 66ko berreskuratze-mailarekin (CTL $40,6 \pm 1,0$ ms, MDX $49,4 \pm 2,2$ ms eta MDX AHK2 $43,6 \pm 1,5$ ms) (24. IRUDIA).



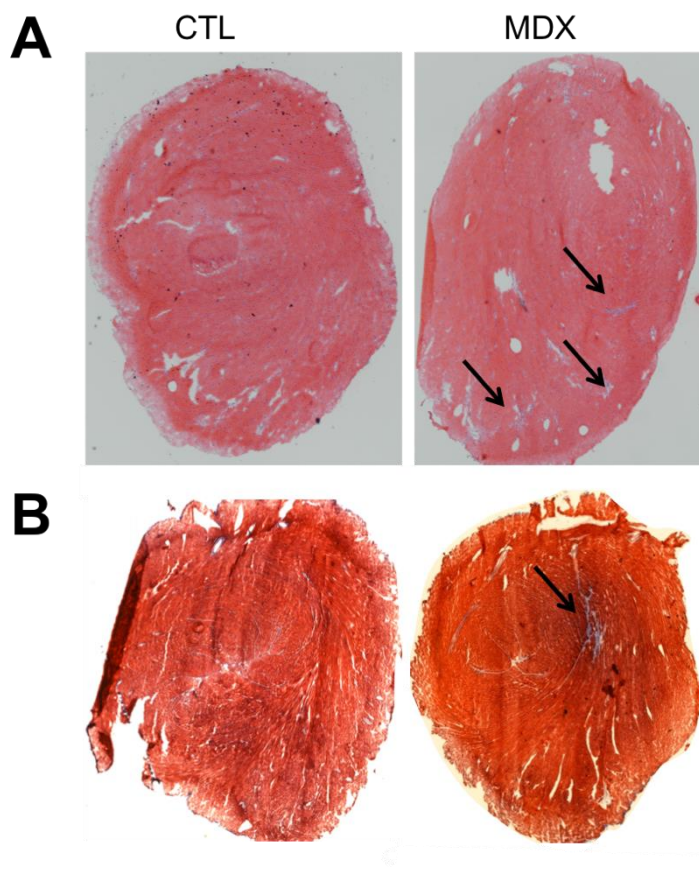
24. IRUDIA. 12 asteko *in vivo*etako saguen 5 minututako elektrokardiograma erregistrotik ateratako datuak. **(A)** Saguen elektrokardiogramaren irudi adierazgarria. **(B)** Talde bakoitzeko, CTL, MDX eta MDX AHK2 0,25 mg/ml, taupada adierazgarri bat. **(C)** Saguen taupaden frekuentzia. **(D)** Saguen taupadetako Q eta T puntuen arteko denbora. Azken bi grafikoetako datuak Whisker kaxa-diagraman irudikatu dira; $n = 3$ CTL, $n = 8$ MDX eta $n = 8$ MDX AHK2; (C)-n CTL vs MDX $p = 0,02$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,02$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,93$ eta (D)-n CTL vs MDX $p = 0,01$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,33$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,04$ (Mann-Whitney testa eta t test ez-binakatua).

Tratamenduak bihotz-taupaden frekuentzia erreskatatzen ez badu ere, QTc tartea normalizatzen duela egiaztatu da, hots, AHK2ak bihotzak taupada baten ostean birpolarizatze behar duen denbora, mdx saguetan luzeagoa dena, laburtzen du.

Histologia

Bihotzaren zeharkako-sekzioak aztertu dira nekrosia eta fibrosia ote duten ikusteko. H&E tindaketa bidez mdx saguek nekrosi oso gutxi dutela ikusi da ($< 5\%$). Masson trikromiko tindaketa bidez fibrosia ikusi daiteke, eta aurreko kasuan bezala, mdx saguen bihotzek ia ez dute fibrosirik. Batez beste taldeko 4-5 saguren bihotzak aztertu dira, eta estatistikoki ez da alde nabarmenik ikusi.

2. KAPITULUA



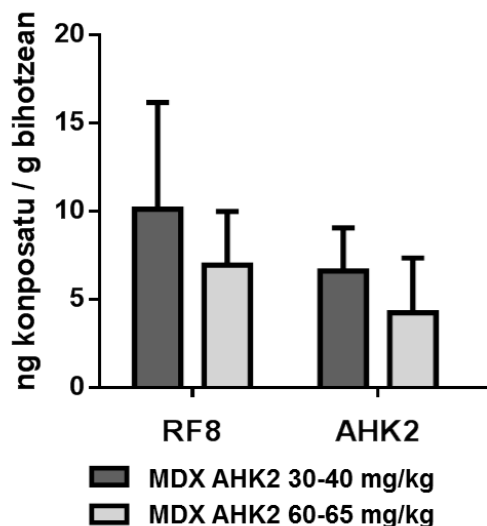
25. IRUDIA. Bihotzaren azterketa histologikoa. **(A)** Hematoxilina-eosina tindaketa, geziekin nekrosi-guneak adierazi dira. **(B)** Masson trikromiko tindaketa, geziekin fibrosi-guneak adierazi dira.

4 hilabete pasatxo (17-18 aste) dituzten mdx saguen bihotzetan nekrosi eta fibrosi zantzuren bat ikusi daitekeen arren, ez dago aldaketa nabarmenik kontrolen bihotzekin alderatzerakoan. Honela, badirudi 4 hilabeterekin mdx saguek oraindik bihotzearen egitura bere horretan mantentzen dutela. Gainera, hemen datu zehatzak adierazi ez badira ere, bihotzen pisua ere aztertu da, eta animalien pisuarekin normalizatzean ez da alderik ikusi hiru taldeen artean. Hau guztia esperotako emaitza da, izan ere, mdx saguetan kardiomiopatia distrofikoa 21 hilabetetik aurrera garatzen dela deskribatu izan da (Wasala, Bostick, Yue, & Duan, 2013), eta beraz, 4-5 hilabeterekin ez zen aldaketa anatomiko handirik espero.

Oro har, bihotzean lortutako emaitzak ikusirik, AHK2ak sagu distrofikoek dituzten sintoma subkliniko fisiopatologikoak partzialki erreskatatzen dituela ondorioztatu daiteke, sintoma patologiko larriak azaleratu aurretik.

AHK2ren kontzentrazioa bihotzean

AHK2a bihotzera iristen dela ziurtatzeko kromatografia bidez AHK2ren zein honen metabolitoa diren RF8 eta RF6ren kontzentrazioa neurtu da modu oralean 5 astez tratatutako saguetan. Lagin hauetan guztietan RF8 metabolitoa eta AHK2 molekula detektatu ahal izan dira, nahiz eta ez diren dosiaren baitako kontzentrazioak neurtu (26. IRUDIA). RF6, ordea, ez da detektatu.



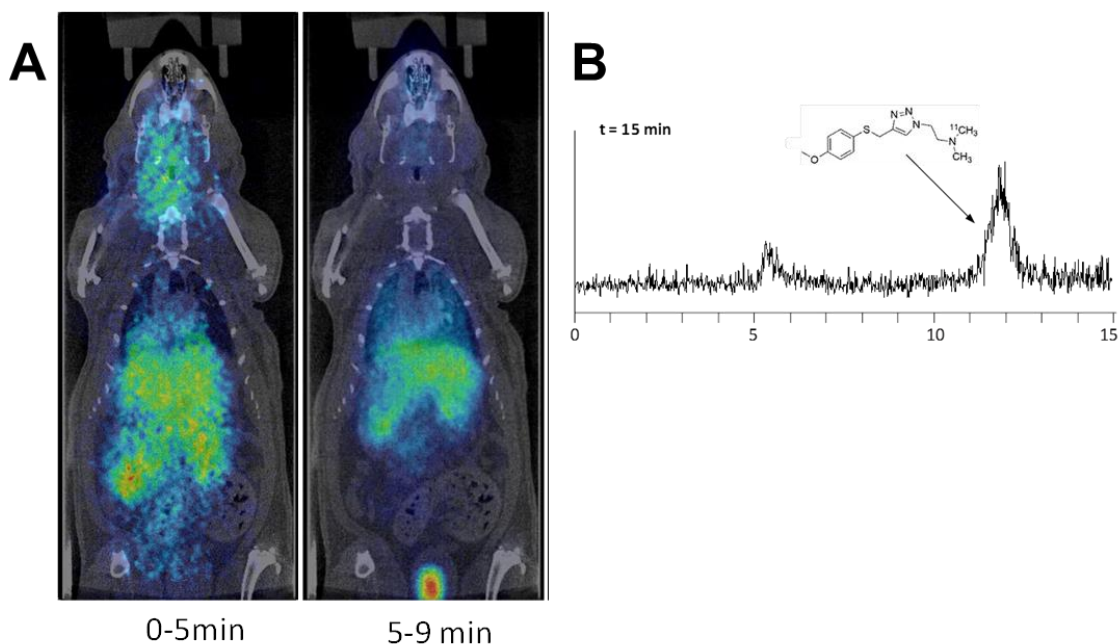
26. IRUDIA. AHK2 molekularen eta RF8 metabolitoaren kontzentrazioak AHK2arekin tratatutako saguen bihotzean AHK2a aho bidez administratu eta gero. Datuak batezbestekoa \pm SEM gisa irudikatu dira; $n = 4$ taldeko.

Kasu honetan ere AHK2a eta RF8 metabolitoa bihotzera heltzen direla baieztatu da. Detektatutako kontzentrazioak giharretakoen maila bertsuan daude, 5-15 ng/g tartean hain zuzen, bai AHK2 eta baita RF8 ere.

Funtzio kognitiboa

AHK2aren bioerabilgarritasuna

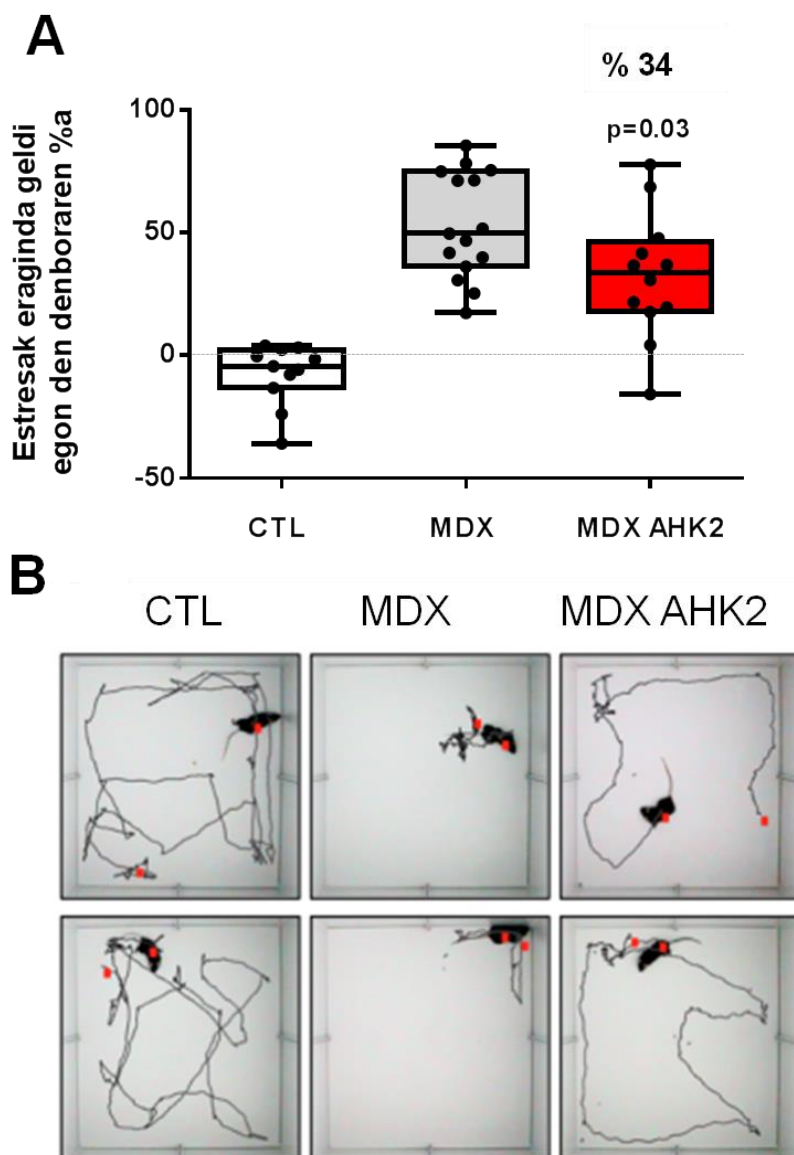
Jordi Llopek arratoietan egindako bioerabilgarritasun-probetan AHK2ak barrera hematoentzefalikoak gainditzen duela baieztatu da (27. IRUDIA, A). Gainera, injekzioa baino 15 minutu beranduago garuna jaso da eta HPLC bidez AHK2a detektatzeko gai izan dira (27. IRUDIA, B).



27. IRUDIA. (A) PET irudi bidez ^{11}C radio-isotopoaz markatu den AHK2aren bioerabilgarritasuna ikusi daiteke arratoietan. (B) HPLC bidez garunean detektatu den AHK2aren pikoak.

Estresak eraginda izoztuta gelditu diren denboraren neurketa

Saguen jokaera aztertzeko egin den aurreneko frogia izan da *freezing test* deiturikoa, mdx saguek ezberdintasun esanguratsuak erakusten dituzte eta entsegu honetan. Estres akutu baten ondoren sagu distrofikoak izoztuta bezala, geldi-geldi, geratzen dira, eta badirudi nerbio-sistema zentraleko arazoekin lotura duela (Goyenvalle et al., 2015). Geldi egon diren denboraren ehunekoa kalkulatu da, estresa eragin ondoren eta estresa eragin gabe. Honela, 28. irudian ikusi daitekeen moduan, tratatu gabeko mdx saguek % 60 denbora gehiago pasatu dute izoztuta bezala estresaren eraginez, eta AHK2arekin mdx saguek % 34ko berreskuratze-maila dutela ikusi da (CTL % $-7,6 \pm 3,8$, MDX % $53,1 \pm 5,6$ eta MDX AHK2 % $32,3 \pm 7,5$).



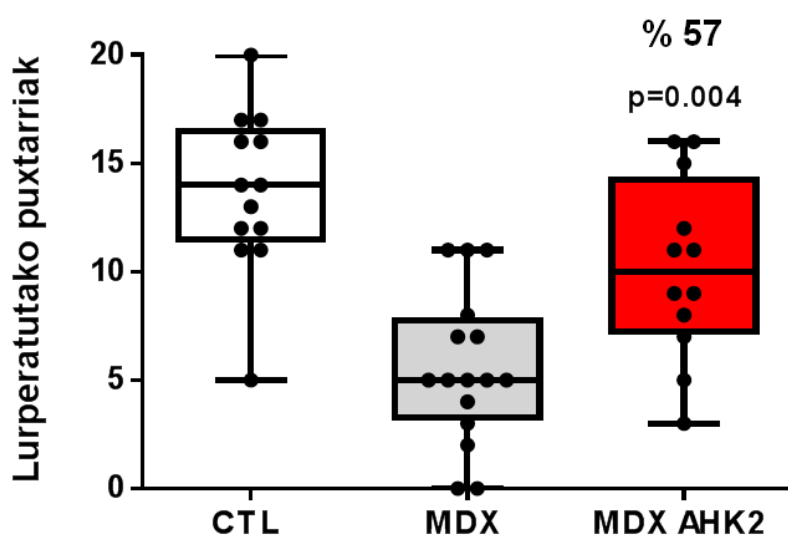
28. IRUDIA. 12 asteko *in vivo*etako saguak grabatu eta gelditu, izoztuta bezala, egon diren denboraren neurketak. **(A)** Grafiko honetan estresak eraginda gelditu egon diren denboraren ehunekoa adierazi da (estresaren ondoren gelditu egon diren denboraren %a – estresik eragin gabe gelditu egon diren denboraren %a). Datuak Whisker kaxa-diagrama gisa irudikatu dira; $n = 11$ CTL, $n = 15$ MDX eta $n = 12$ MDX AHK2; % 34ko berreskuratze-maila; CTL vs MDX $p < 0,0001$, CTL vs MDX AHK2 $p < 0,0001$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,03$ (Mann-Whitney testa eta t test ezbinakatuak). **(B)** Estresa eragin ondoren aurreneko minutuan ibilitako distantziaren *trackinga* ikusi daiteke, taldeko bi sagu adierazgarriren irudiak hautatu dira.

AHK2ak mdx saguen jokoera anormala, hots, defizit neuronalak, erreskatatzen duela baieztatu da proba honen bidez, zehazki estres akutu baten aurkako erantzunean aldaketak eragiten ditu.

2. KAPITULUA

Puxtarriak lurperatzeko gaitasuna

Nerbio-sistema zentralerako defizitak ebaluatzeko beste test kognitibo bat egin da, AHK2ak kognitiboki duen eraginkortasuna hobeto aztertzeko. Proba honen bitartez mdx saguek kontrolak baino puxtarri gutxiago lurperatzen dituztela ikusi da (CTL $13,7 \pm 1,0$ puxtarri vs MDX $5,6 \pm 0,9$ puxtarri), eta AHK2 tratamenduari esker mdx saguek % 57ko berreskuratze-maila izan dute ($10,2 \pm 1,2$ puxtarri). Aldaketa hauek guztiak estatistikoki adierazgarriak izan dira (29. IRUDIA).



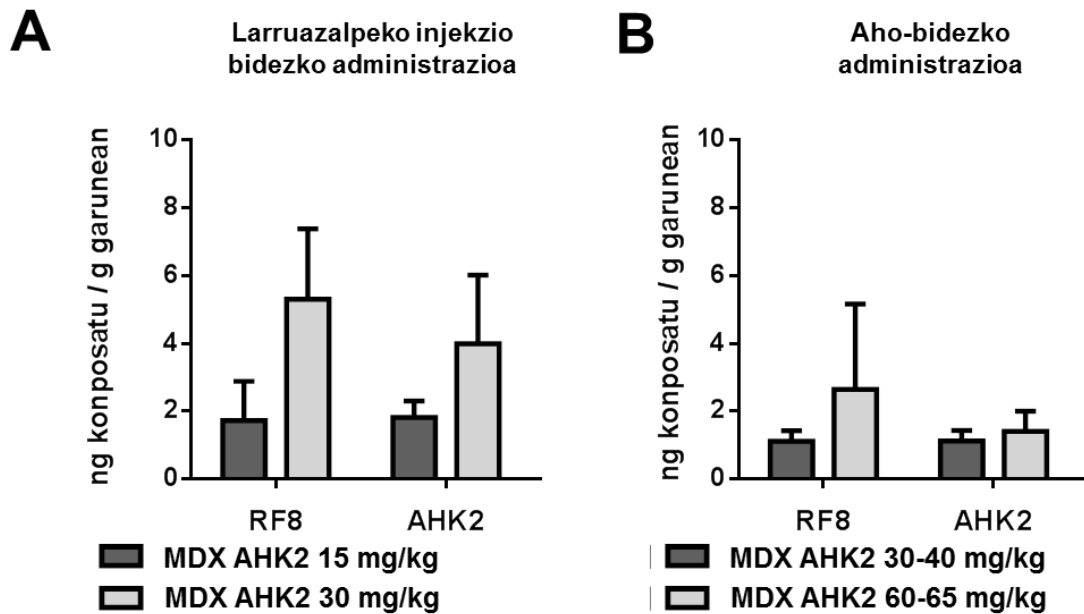
29. IRUDIA. 12 asteko *in vivo*etako saguek 15 minututan lurperatutako puxtarriak. Datuak Whisker kaxa-diagrama gisa irudikatu dira; $n = 13$ CTL, $n = 16$ MDX eta $n = 12$ MDX AHK2; %57ko berreskuratze-maila; CTL vs MDX $p < 0,0001$, CTL vs MDX AHK2 $p = 0,04$, MDX vs MDX AHK2 $p = 0,004$ (t test ez-binakatu).

Emaitza hauei esker proba hau sagu kontrolak mdx saguengandik bereizteko esperimendu baliagarri bezala deskribatu da lehen aldiz, lurperatzen dituzten puxtarrien kopurua erdia baino gutxiago baita ($p < 0,0001$). Gainera, AHK2ak mdx saguek puxtarriekiko duten jokaera aldatzen duela baieztatu da.

AHK2ren kontzentrazioa garunean

AHK2a garunera iristen dela ziurtatzeko kromatografia bidez molekula honen eta bere metabolitoa den RF8 eta RF6ren kontzentrazioa neurtu da tratatutako saguetan. Batetik, 8 egunez jarraian bi dosirekin injektatutako mdx sagu batzuen garunak aztertu dira. Lagin hauetan RF8 metabolitoa eta AHK2 molekula detektatu ahal izan dira, dosiaren araberrako kontzentrazioan gainera (30. IRUDIA, A). Bestetik, edarian AHK2a bost astez

izan duten mdx sagu batzuen garunak aztertu da. Kasu honetan ere AHK2 eta RF8 detektatu dira (30. IRUDIA, B). RF6aren traza batzuk baino ez dira detektatu eta, beraz, azkar metabolizatzen dela eta ez dela metatzen ebatzi da.



30.IRUDIA. AHK2 molekularen eta RF8 metabolitoaren kontzentrazioak AHK2arekin tratatutako saguen garunetan. **(A)** AHK2a injekzio bidez administratu eta 18h beranduago. **(B)** AHK2a modu oralean administratu eta gero.

Emitza hauekin AHK2a mdx saguen garunetara heltzen dela baieztatu da, RF8 metabolitoarekin batera. Gainera, larruazalpeko injekzio bidezko administrazioa izan dutenetan dosiaren baitako kontzentrazioak detektatu dira. Modu oralean administratu ondoren ere RF8 metabolitoak dosiaren baitakoa izaten jarraitzen du, baina AHK2ak ez.

EZTABAIDA

Duchenne muskulu-distrofia giharren kaltetze progresiboa hainbat gertaera patologikoz osatutako sare konplexu bati lotuta dago. Gertaera patologiko horien artean kaltzioaren homeostasian dagoen desregulazioak funtsezko papera du (Vallejo-Illarramendi et al., 2014). Aurrez egindako hainbat ikerketetan rianodina-hartzailea, RyR, izeneko kaltzio-kanala jomugatzat hartu izan da molekula terapeutikoak diseinatzeko garaian, kaltzio-kanal hau itzulpen ondorengo aldaketen bidez kaltetuta baitago distrofina gabeko gihar-eta bihotz-zeluletan, kaltzioaren irteera desegokiari bide emanez (Bellinger et al., 2009; Fauconnier et al., 2010). Rycals izeneko molekulen helburua rianodina-hartzailea eta kalstabinaren arteko elkarrekintza ahalbidetzea da; RyR, itzulpen ondorengo aldaketak jasan eta gero, ezin baita kalstabinarekin zuzen batu eta RyR kaltzio-kanala konformazio irekian gelditzen baita (Andersson & Marks, 2011). AHK molekulak kalstabina modulatzeko helburuarekin sortu dira, kalstabinari eraldatutako RyR kaltzio-kanalei batzeko gaitasuna ematen baitio, hauek konformazio itxian mantenduz. Hain zuzen, mekanismo hau laborategian egiaztatua izan da eta Aldanondo doktorearen tesian erakutsi zen (2017). Lan honetan AHK2 molekulak DMD gaixotasunaren animalia-eredu diren mdx saguetan duen eragina ikertu da, zehazki, gihar eskeletikoan, gihar kardiakoan eta nerbio-sistema zentrolean fenotipo gaixoa duten saguek osasuntsua berreskuratzeko duten gaitasuna neurtu da. Horretarako, *TREAT-NMD Neuromuscular Network*-ek iradokitako operazio-prozedura estandarizatuak, SOP, jarraitu dira, ahal izan den neurrian behinik behin.

AHK2 tratamendua mdx saguetan

Saguek 5 asteko adinarekin hasi dituzte tratamenduak, hastapeneko endekapen-birsortze eta nekrosi fasean daudenean alegia, eta denbora horretan mdx saguei AHK2 eman zaie edarian. Ondoren, pisua eta ur-kontsumoaren datuekin, hartu duten batez besteko dosia 30 mg AHK2/kg GM/ eguneko izan dela kalkulatu da. Denbora honetan zehar saguen pisua, ur-kontsumoa eta itxura aztertu ondoren, AHK2 molekulak faktore hauetan eraginik ez duela ondorioztatu da, ez baitago ezberdintasun adierazgarriarik taldeen artean eta ez baita aldaketa makroskopiko esanguratsurik ikusi saguen anatomian. Gainera, 12 astez 30 mg AHK2/kg GM/ eguneko dosian eman zaien sagu kontrol eta mdx saguen gibelaren eta giltzurrunaren histopatologia aztertu da eta ez da toxikotasun

zantzurik ageri. Aurrez, S107 eta ARM210 molekulekin mdx saguak tratatu ostean ez zuten aparteko toxikotasunik deskribatu (Bellinger et al., 2009; Capogrosso et al., 2018), eta ez dirudi AHK2ak ondorio toxikorik duenik.

Bestalde, ondoren aztergai izango diren ehun desberdinetara AHK2a iristen ote den jakin nahi izan da. Zehazki, saguak tratatu eta sakrifikatu ostean, giharreko, garuneko eta bihotzeko hainbat laginetan AHK2 konposatuaren eta bere bi balizko metabolitoen, RF6 eta RF8, kontzentrazioa neurtu da. Honela, AHK2a diana diren hiru ehunetara iristen dela egiaztatu da: gihar eskeletikora, bihotzera eta garunera hain zuzen, hesteetako barrera eta barrera hematoentzefalikoa gainditu ondoren. Gainera, RF8 deituriko AHK2aren metabolitoa ere hiru ehun hauetan detektatu da, eta metabolito honek RyR-kalstabina elkarrekintza modulatzeko gaitasuna izan dezakeela uste da. RF6 metabolitoari dagokionez, ordea, ez dela ehunetan metatzen eta berehala kanporatzen dela ondorioztatu da, aztertutako lagin bakan batzuetan trazaren bat detektatu baita soilik.

Larruazalpeko injekzioak bi dositan egin dira (15 eta 30 mg/kg) ehun desberdinetan AHK2 eta bere metabolitoen akumulazioa neurtzeko. Honela, azken injekziotik 18 ordura AHK2a detekzio-mailatik kanpo dago serumean, baina RF8 metabolitoa identifikatu ahal izan da, 2 ng/ml-ko kontzentrazioan (emaitza hauek ez dira erakutsi). AHK2a kontzentrazio baxuan metatzen da muskulu eskeletikoan (< 5 ng/g) eta garunean (2-4 ng/g). Emaitza hauek AHK2a RF8an metabolizatzen dela adierazten dute eta ondoren organismoak berehala kanporatzen duela. AHK2a zein RF8a garunean dosiaren baitan metatzen dira, baina giharrean ez da joera hau ikusi, ziurrenik kanporatze azkarra dela eta. Etorkizunean neurketak injekzioaren ondorengo denbora ezberdinetan egin beharko dira AHK2 eta RF8aren metaketa dosiaren baitakoa den edo ez argitzeko. Aho bidezko administrazioa ere bi dositan egin da, nahiz eta neurtutako kontzentrazioak ez datozen bat dosiarekin; kasu honetan giharrean detektatu dira AHK2 eta RF8 kontzentrazio altuenak, ondoren bihotzean eta azkenik garunean. Azpimarratzekoa da tratamendua aho bidez ematean ezin dela administrazio ondorengo denbora kontrolatu, eta honek aldakortasun handiagoa eragin dezake sagu batetik bestera.

Tratamendurako AHK2 hautatzearen arrazoa arratoietan erradioaktibitate bidez barrera hematoentzefalikoa gainditzeko duen gaitasuna izan da, baina emaitza hauek ikusi ondoren, oso azkar metabolizatzen dela dirudi. Horregatik, etorkizunean molekula honi aldaketa kimikoak egitea komenigarria izango litzateke diana diren ehunetan metaketa hobetzeko.

Funtzio muskularra

Duchenne muskulu-distrofiak, izenak adierazten duen bezala, giharrei eragiten die nagusiki, gaixotasunaren hastapenetan batik bat. Funtzio muskularra aztertzeko probek potentzial terapeutikoa duten konposatuek giharren patologian duten eragina ebaluatzeko balio dute. Honela, mdx saguek kaltetuta duten funtzio muskularrean AHK2ak duen efikazia neurtzeko hainbat proba egin dira lan honetan. Aurrez 5 asteko tratamenduak egin ziren AHK2arekin (Aldanondo, 2017) gihar distrofikoetan zuten eragina neurtzeko, maila funtzionalean zein histopatologikoan hobekuntzak lortuz. Analisi histopatologikoan, zehazki, nukleo zentralen ehunekoa zenbatu da, izan ere nukleo zentralak degenerazio-birsortze prozesuaren adierazle dira, kalterik gabeko gihar-zuntzek nukleoa periferian baitute, eta giharrek jasandako kaltea kuantifikatzeko balio dute (Dubach-Powell, 2011). Ikerlan honetan emaitza horiek iraupen luzeagoko tratamenduak eginez mantentzen ote diren jakin nahi izan da, eta horretarako 12 asteko tratamenduak egin dira.

Emaitzak aztertu ondoren ondorioztatu daiteke, funtzio muskularrari dagokionez, aurrez 5 asteko tratamenduetan lortutako emaitzak ez direla guztiz errepikatu 12 asteko tratamenduarekin, nahiz eta antzeko joerak ikusi diren: aurreko hanken euste-indarrean eta diafragma zein TA giharreko nukleo zentraletan aldaketa esanguratsuak ikusi ziren 5 asteko AHK2 tratamenduarekin (Aldanondo, 2017) eta lan honetan joera berdina izan duten arren ez dira estatistikoki hobekuntza adierazgarriak izan. Baliteke, mdx saguak adinean aurrera egin ahala patologia larriagotzen denez, AHK2 tratamendu eta dosi berdinak epe luzeagoan horrenbeste eraginkortasun ez izatea. Gainera, giharretako AHK2 kontzentrazioak aztertu ondoren, eta metabolismo azkarra duela kontuan izanda, agian giharretara iristen den AHK2 kantitatea ez da nahikoa horren eraginkorra izateko patologia aurrera egin ahala.

12 asteko tratamenduaren ostean hainbat proba gehigarri egin dira. Besteak beste, oin-zolako gihar flexeoreen indarra aztertzeko indar-frekuentzia erlazioa adierazten duten kurbak egin dira eta kurba hauetako puntu gorena hartu da indar tetaniko isometrikotzat. Sagu kontrol eta mdx saguen artean desberdintasun esanguratsuak ikusi badira ere, AHK2 tratamenduarekin ez da hobekuntzarik ikusi. Dena den, kurba hauek egitean frekuentzia altuagotara ere neurketak egiten jarraitu beharko litzateke, ez baitira *plateau* egoerara iritsi, eta, beraz, ezin da jakin ziur 100 Hz-tara lortzen duten indar tetaniko isometriko maximoa. Aurrez mdx saguen oin-zolako giharren indarra neurtzen duten beste lan batzuk argitaratu badira ere, ez da oraindik prozedura estandarizaturik, SOP,

adostu *TREAT-NMD Neuromuscular Network*-en. Baltgalvis-en (2012) lanean nerbio ziatikoa estimulatuz 300 Hz-ko frekuentziaraino neurtu zuten oin-zolako giharren indarra, nahiz eta 100 Hz-tik aurrera *plateaura* iristen zirela dirudien. Capogrosso-k egindako lanean (2017), ordea, estimulazioa zuzenean elektrodoak *tibialis anterior* giharreko nerbioan jarriz egin zituzten, kasu honetan, 200 Hz-raino, eta hemen ere indar tetaniko maximoa 100 Hz-tara lortzen zela ikusi zen. Azken lan honetan saguak ariketa fisikoa egitera behartu eta gero, korrika egiteko zintan saguak maiz jarriz, ezberdintasun nabarmenagoak ikusi zituzten sagu kontrol eta mdx saguen artean. Beraz, indar tetaniko isometrikoa neurtzeko protokoloa optimizatzeaz gain, aukera ona litzateke saguak ariketa behartuak eginaraztea, desberdintasun tartea areagotuz tratamendua eman ondoren hobekuntzarako ere tarte handiagoa egongo litzatekeelako.

Diafragmaren indarra ere neurtu da *in vitro*. Indar tetaniko isometrikoa aztertzean, kontrolek indar gehixeago duten arren, ez da desberdintasun adierazgarririk ikusi hiru taldeen artean (sagu kontrolak, mdx saguak eta AHK2arekin tratatutako mdx saguak). Adin horretako saguen diafragmak aztertzeko indar-neurketa protokolo egokia hautatzea izan beharko litzateke aurreneko pausua, behin genotipo ezberdinen arteko saguetan desberdintasunak daudela identifikatzean tratamenduen efektuak aztertzeko.

Bestalde, diafragmen indar eszentrikoa ere aztertu da. Indar eszentrikoaren neurketak gihar-zuntzetako mintzaren edo sarkolemaren egoeraren berri ematen digu, eta lan honetan 4 hilabeteko mdx saguen diafragmek mintz hori kaltetuta dutela ondorioztatu da saguen diafragmak aztertzean. Aurrez ere deskribatu da mdx saguek kontrakzio eszentrikoen ondorioz indar galera izaten dutela, izan ere distrofina ez izateak lotura neuromuskularraren morfologian, sarkolemaren kitzikakortasunean eta miozuntzeken funtzioan eragiten du (Olthoff et al., 2018). Lan honetan, AHK2 tratamendua uzkurdua eszentrikoen ondorioz galtzen duten indarra berreskuratzen laguntzen duela erakutsi da, zehazki hirugarren uzkurduraren ondoren tratatu gabeko mdx eta tratatutakoen artean estatistikoki desberdintasun adierazgarriak ikusi dira. Beraz, AHK2ak diafragmako gihar-zuntzen mintza nolabait egonkortzen duela dirudi.

Kaltetutako giharren sarkoplasmatik odolera ihes egiten du kreatina kinasak (CK), horregatik serumean CK maila neurketak egitea ohikoa da DMD gaixoetan, bai diagnosirako, baita tratamenduen bilakaera monitorizatzeko ere (Hathout et al., 2016). Mdx saguetan ere deskribatuta dago CK maila altuak dituztela serumean (Carlson, 2014) eta lan honetan ere hala dela ikusi da. Gainera, AHK2a edan duten mdx saguek % 34ko berreskuratze-maila dutela ikusi da, nahiz eta aldaketa hau ez den estatistikoki

2. KAPITULUA

esanguratsua izan. Aldanondo doktoreak egindako lanean bost astez tratamendu berdina izan zuten mdx saguek ere CK maila baxuagoa zutela ikusi zen, baina kasu honetan ere emaitzak ez ziren estatistikoki adierazgarriak izan (Aldanondo, 2017). Beste Rycals-ekin eginiko probetan emaitza kontraerriak ikusi dira. Batetik, S107 molekulak mdx saguetan odoleko CK maila jaisteko gaitasuna zuela baieztatu zuten (Bellinger et al., 2009). Gero, molekula honen ondorengoa den ARM210-arekin egindako lanetan ez dute emaitza hau errepikatu, eta molekula honek CK mailan eraginik ez duela adierazi zuten 4 eta 12 asteetako *in vivo*ak amaitzean (Capogrosso et al., 2018).

Bestetik, MYOM3 proteinaren mailak ere neurtu dira serumean. Miozuntzeketan funtzio estrukturala duen proteina honen zatiak (100 eta 130 KDa-koak) serumera ateratzen dira kaltetutako giharretan. Horregatik, serumeko MYOM3 proteina-maila Duchenne muskulu-distrofian biomarkatzaile gisa deskribatu da, bai gizakietan eta baita animalia-eredu ezberdinetan, horien artean mdx saguetan; gainera, tratamenduak monitorizatzeko baliagarria izan daitekeela ere ondorioztatu izan dute (Rouillon et al., 2015). Lan honetan, sagu kontrolen serumean ez da MYOM3 zatien arrastorik ikusi eta mdx saguen serumetan, esperotako bi zatiak detektatu dira Western Blot bidez. Hala ere, AHK2 tratamenduak ez dute mdx saguek serumean duten MYOM3 proteina-maila jaisten.

Funtzio kardiakoa

Bihotzaren funtzionamendua ikertzeko 4 hilabetetako sagu emeak erabili dira. Kasu honetan emeak hautatu dira lan batzuetan hala hobesten dutelako, heldutasunera iristean fenotipo distrofikoa argiago azalerraten dutela dirudi eta (Bostick et al., 2010). Esperimentu hauek guztiak Gema Ruiz-Hurtadoren *Cardiorenal laboratory*-n egin dira Madrileko *12 de Octubre* ospitalean.

AHK2 12 astez edarian izan duten kardiomiozitoak ikertu aurretik, kontzeptu-proba moduko bat egin da bihotzeko zelula hauek *in vitro* tratatuta. Mdx saguen kardiomiozitoak isolatu eta kaltzioa markatzeko zundarekin inkubatzean AHK2aren kontzentrazioa ezberdinak gehitu zaizkie ondoren *spark* edo kaltzio-txinparten frekuentzia neurtzeko. *Spark* hauen erantzuleak gaizki itxitako RyR kaltzio-kanalak dira, eta hauek modu egokian ixtea ahalbidetzea da AHK2 molekulen itua. Proba honen bidez AHK2ak bihotzeko RyR2 kanaletan eragin zuzena duela ikusi da, mekanismoa baieztatuz. Abiapuntu honi jarraituz, 12 astez modu oralean tratatutako mdx saguen bihotzeko hainbat ezaugarri aztertu dira.

Funtzio kardiakoa aztertzeke lehendabizi elektrokardiogramak egin zaizkie saguei lokartuta zeudela 12 astez AHK2arekin tratatu eta gero, eta bertan taupaden frekuentzia altuagoa dela eta QTc tarte, hots, taupada baten ondoren bihotzak birpolarizatzeko behar duen denbora, luzeagoa dela ikusi da mdx saguetan aurrez deskribatu zuten bezala (Fauconnier et al., 2010). Tratamenduak bihotz-taupaden frekuentzia aldatzen ez badu ere, QTc tarte laburtzen duela ebatzi da, hau da, AHK2ak bihotzak taupada baten ondoren birpolarizatzeko behar duen denbora, mdx saguetan luzeagoa dena, laburtzen du.

Kardiomiozitoak erauzi eta kaltzioaren fisiologia aztertu da gero. Estimulazio elektrikoarekin kaltzioaren mugimendu zitosolikoak neurtu dira, bihotza sistole egoeran dagoela simulatuz. AHK2ak kaltziora erretikulu sarkoplasmikora birkaptatzen laguntzen duela ikusi da, Tau edo kaltzio jaitsieraren malda aztertzean mdx saguen kardiomiozitoek luzatuta duten denbora laburtzen baita tratamenduarekin. Honek adierazten du SERCA kaltzio ATPasaren funtzioa kaltetuta dagoela eta kaltziora erretikulura adsorbatzeko ahalmena desgaituta dagoela mdx saguen kardiomiozitoetan (Navarro-Garcia et al., 2019), eta AHK2ak mekanismo hau hobetzen duela dirudi. SERCA kaltziora zitosoletik erretikulu sarkoplasmikora ATPa kontsumituz sartzen duen kaltzio-bomba eta, beraz, kaltzioaren homeostasian ezinbesteko papera duen proteina da. Beste lan batzuetan adierazi izan dute SERCAren adierazpena apalagoa dela mdx saguetan eta SERCA gain-adierazpenak patologia distrofikoa arindu dezakela (Mázala et al., 2015). Honela, badirudi AHK2ak zeharka SERCAren funtzioan ere eragina duela.

Erretikulu sarkoplasmikotik espontaneoki ateratzen diren kaltzio-txinpartak RyR kanala irekita egotearen probabilitatearekin lotzen dira eta diastolean gertatzen diren kaltzio-jarioen adierazle direla uste da (Cheng & Lederer, 2008). Espero bezala, mdx saguen kardiomiozitoek kaltzio-txinparta edota *spark* gehiago dituzte, RyR2 kanala ez baitago ondo itxita fosforilazioak eta nitrosilazioak direla eta. Gainera, AHK2ak eragin zuzena duela ikusi da RyR kanala ixten, izan ere tratatutako zelulek *spark* gutxiago dituzte, % 59ko berreskuratze-mailarekin. Honela, hasieran AHK2arekin *in vitro* eginiko tratamenduekin lortutako emaitzak baieztatu dira, molekula hau modu oralean 12 astez administratuta efektu bera ikusi baita.

RyR2 bidezko kaltzio-jario ez kontrolatuek arritmiak sor ditzakete, eta honek birpolarizazioan atzerapenak sor ditzake (Lehnart et al., 2006). Aldanondo doktorearen tesian (2017) AHK1ek eta AHK2ak giharretako RyR1 eta kalstabinaren arteko elkarrekintzan zuten eragina demostratu zen bezala, lan honetako emaitzek AHK2ak

2. KAPITULUA

bihotzean duen ekintza-mekanismoa kalstabina modulatzeko dela egiaztatzen dute, kalstabina eraldatuta dagoen RyR2 kaltzio-kanalari batu eta azken hau konformazio itxian mantentzea ahalbidetzen baitu.

Funtzio kognitiboa

Duchenne muskulu-distrofia duten gizakien % 30 inguruk dituzte nerbio-sistema zentralarekin lotutako arazoak (Rae & O'Malley, 2016). Mdx saguek kalte kognitiboak azaleratzen dituzte heldutasunera iristean (Lewon et al., 2017), horregatik funtzio kognitiboa ikertzeko 12 asteko tratamenduen ondoren 4 hilabeteko animalia arrekin lan egitea erabaki da, adin honekin ikusi baita fenotipo kaltetua egin diren probetan. Arrak bakarrik hautatu dira sexuaren aldagaia baztertzeko.

Lehenik eta behin, AHK2ak barrera hematoentzefalikoa gainditzeko ahalmena duela frogatu nahi izan da. *In silico* eginiko probek hori adierazten bazuten ere, benetan molekula hau garunera heltzen dela ikusteko bioerabilgarritasun probak egin dira AHK2rarekin injektatutako arratoietan. PET irudi bidez ^{11}C radio-isotopoz markatutako AHK2ak barrera hematoentzefalikoa pasatzen duela baieztatu da, eta injekzioa jarri eta 15 minutura garuna erauzi eta kromatografia bidez AHK2ak bertan jarraitzen duela ikusi da.

Behin AHK2 molekula garunera heltzen dela ziurtatuta, mdx saguak 12 astez tratatu eta funtzio kognitiboa aztertzeko bi proba egin dira. Lehenengo proban estresak eraginda izoztuta bezala gelditu diren denbora neurtu da. Proba hau aurrez deskribatu izan da mdx saguen jokoera kognitibo anormala azaleratzeko (Goyenvalle et al., 2015). Inoiz saguen genotipoaren inguruan zalantzarik izanez gero, proba hau egitean berehala igarri daiteke saguak kontrolak edo mdx-ak diren, estres honek ez baitu inolako eraginik sagu kontrolen mugimenduan, eta, mdx saguetan, aldiz, paralizatuta edo izoztuta bezala gelditzen dira denbora luzean. AHK2a edan duten saguek nabarmen egin dute hobera, eta estresak eraginda izoztuta bezala geratu diren denborak behera egin du. DMD duten paziente batzuek dituzten defizit kognitibo eta sintoma psikiatrikoak bat datozen saguek mehatxu baten aurrean areagotuta duten defentsa-jokaerarekin. Defentsa-jokoera hau izoztuta bezala gelditzea da immobilizazioak eragindako mehatxu edo estresaren ondoren, eta nerbio-sistema zentralarekin lotuta dagoela uste da, eta ez sistema motorean, kardiakoan edo arnasketan mdx saguek izan ditzaketan akatsekin (Yamamoto et al., 2010).

Bigarrenengan, saguek 15 minututako denboran puxtarriak lurperatzeko duten gaitasuna neurtu da. Mdx saguek kontrolek baino puxtarri gutxiago lurperatzen dituzte nabarmen, eta AHK2 tratamenduaren ondorioz mdx saguek puxtarriak lurperatzeko gaitasuna % 57 berreskuratzen dute modu adierazgarrian. Aurreneko aldia da mdx saguetan puxtarriak lurperatzeko proba egin dela, literaturan ez da halakorik deskribatu animalia-eredu honetan, eta kontrolekin alderatzean desberdintasun nabarmenak daudenez, proba bezala interesgarria da beste tratamendu edo terapia batzuen eragina aztertzeko. Batzuen arabera saguen jokaera normala objektu ezezagunak lurperatzeko joera izatea da, ingurune berri bati erantzuna emateko modua litzateke eta antsietatearekin eta obsesibo-konpulsibo portaerarekin lotuta dago (Domingues et al., 2019; Robinson, Jones, Brynildsen, Ehrlich, & Blendy, 2019). Beste batzuen iritziz, saguentzat puxtarriak objektu ez-kaltegarriak dira, animaliek ez dute objektu hauetan arriskurik ikusten eta, beraz, lurperatzen badituzte, berezkoa duten induskatzeko joeragatik da eta ez du zerikusirik antsietatearekin; gainera, ez dute loturarik ikusi puxtarriak lurperatzeko gaitasunaren eta antsietatea zein esplorazio-gaitasuna neurtzeko beste proba batzuetako emaitzen artean (Deacon, 2006; Thomas, 2010). Beraz, nahiz eta oraindik puxtarrien testak zehazki zer neurtzeko balio duen argi ez egon, zalantzarik gabe mdx saguen fenotipo anormalaren adierazle dela ikusi da lan honetan, eta, horregatik, potentzial terapeutikoa duten tratamenduen efikazia neurtzeko baleko probatzat hartu da.

Honela, AHK2ak mdx saguen hainbat portaera distrofiko aldatzeko duen eraginkortasuna adierazi da. Dena den, ez da AHK2ak garunean duen mekanismoa frogatzeko probarik egin.

Orain arte Rycals konposatuak ez dira mdx saguen neuronetako RyR-ak modulatzeko erabili izan, lan honetan aztertu da aurreneko aldiz animalia-eredu honetan rianodina-hartzailearen eta kalstabinaren lotura ahalbidetzen duen, eta ondorioz, kaltzio-kanal honen funtzionamendu egokia berrezartzen duen molekula baten eragina funtzio kognitiboan. Rianodina-hartzaileak funtzio garrantzitsua du uzkuartzen diren zeluletan; zelula hauek seinale elektrikoa jasotzen dute, rianodina-hartzaileek erretikulutik kaltzioa askatuz erantzuten dute, eta kaltzio honek aktina eta miosina uzkuartzeko seinalizazioan parte hartzen du. Beraz, zelula uzkurgarriek seinale elektrikoa ekintza mekanikoan bilakatzen dute eta funtsezko papera jokatzen du bide horretan rianodina-hartzaileak. Garuneko zelulak, ordea, ez dira uzkuartzen diren zelulak, baina hauek ere zelula kitzikagarriak dira, kasu honetan seinale kimikoa estimulu elektrikoan bilakatzen dute, tartean kaltzioak parte hartzen du, eta neuronetako rianodina-hartzaileek ere kaltzioaren seinalizazioan funtsezko rola dute (Grienberger & Konnerth, 2012). S107 molekulak

2. KAPITULUA

neuronetako RyR2 modulatzeko duela ikusi da induzitutako estresak eraginda disfuncio kognitiboa duten saguetan (Liu et al., 2012), beraz, aurrez DMD animalia-ereduetan emaitzarik ez bazegoen ere, RyR modulatuak gaitz kognitiboetan eragin positiboa izan zezakeela deskribatuta zegoen. Mdx saguen neuronetan kaltzioaren homeostasia desregulatuta dagoela baieztatu izan da (Lopez et al., 2016). Lopezen lanean kaltzio intrazelularraren deshomeostasiak mdx saguetan defizit kognitiboak sortzen dituela erakutsi zuten, kaltzio intrazelularraren mailak jaitsiz arazo kognitiboak gutxitzen zirela ikusi baitzuten; eta, beraz, AHK2ak kaltzioaren homeostasia berrezartzen lagundu duela pentsa liteke, eta honi esker lortu direla hobekuntzak lan honetan aurrezitutako proba kognitiboetan. Halere, ez dira AHK2aren mekanismo-ekintza hau egiaztatzen duten esperimentuak egin eta, beraz, mdx saguen neuronetan kaltzioaren egoera begiratzea interesgarria izango litzateke, mikroskopia konfokalean RyR kanal jariakorrak dauden edo ez kaltzio-txinparten bidez ikusi eta AHK2ak hauek modulatu dituen edo ez aztertzeko. Bestelako froga batzuk ere egin daitezke, besteak beste PLA, *proximity ligation assay*, probaren bidez RyR eta kalstabinaren loturak aztertu daitezke, Aldanondok tesian (2017) giza-miotubo distrofikoetan egin zuen bezala, baina tratatutako saguen neuronetan. Horrez gain, RyR immunoprecipitatu daitezke eta kalstabina lotuta edo ez ikusi daitezke aurrez beste lan batzuetan mdx saguen giharretan eta bihotzean egin duten bezala (Bellinger et al., 2009; Fauconnier et al., 2010). Gainera, kasu honetan ere, AHK2ak eragiten dituen hobekuntzak identifikatzeko, proteomika eta transkriptomika azterketak egitea beharrezkoa izango litzateke, batetik mdx saguen garunetan kaltetuta dauden mekanismoak zein diren ezagutzeko, eta, bestetik, AHK2ak sortzen dituen aldaketak zein bide edo bidezidor modulatu datozen jakiteko.

Eztabaida orokorra

Emaitza hauek guztiak kontuan izanik, AHK2ak hainbat aspektutan onurak dakartzala ondorioztatu daitezke. AHK2ak hobekuntzarako joera erakutsi du 12 asteko tratamenduen ondoren mdx saguetan zenbait defizit muskularrei dagokionez, nahiz eta hobekuntza esanguratsua izan zen gaixotasunaren estadio goiztiarrean. Bihotzaren funtzioa ikertzean AHK2aren eragina argiagoa izan da, molekula honek RyR2 kanaletako kaltzio-jario espontaneoak kontrolatzen dituela erakutsi da eta erretikulu sarkoplasmikora doan kaltzioa birkaptatzen duten SERCA bonben funtzioa ere hobetzen du; honek nolabait, elektrokardiogramen bidez neurtu diren QTc tartek erreskatatzen dituela ikusi da, bihotzak taupada bakoitzean birpolarizatzeko behar duen denbora laburtuz. Gainera,

diseinatzerako garaian espero zen bezala, AHK2a garunera heltzen dela baieztatu da; batetik ^{11}C radio-isotopo bidez barrera hematoentzefalikoa pasatzen duela ikusi da arratoietan eginiko probetan, eta, bestetik, AHK2arekin tratatutako mdx saguetan ere AHK2 eta RF8 metabolitoaren presentzia detektatu da garuneko laginetan masa-HPLC bidez. Garunera heltzen dela egiaztatzearekin batera, AHK2ak mdx saguen hainbat defizit kognitibo hobetzen dituela ere baieztatu da lan honetan, ustez hipokanpoaren funtzioaren hobekuntzekin lotuta.

Ekintza-mekanismoari dagokionez, gihar muskularrean eta gihar kardiakoan AHK2aren itua RyR kaltzio-kanal jariakorren funtzionamendua konpontzea izan dela uste da, kalstabina edo FKBP12/12.6 modulatu. Aurrez argitaratutako lanean giharretako RyR1 eta kalstabinaren elkarrekintza modulatu zuela baieztatu zen (Aldanondo, 2017) eta lan honetan kardiomiotoetan ere RyR2 kaltzio-kanalen funtzionamendu egokia berrezartzen duela adierazi da. Dena den, AHK2a FKBP12/12.6ari batu eta hau modulatzeko diseinatu bada ere, rianodina-hartzailearen eginkizuna berrezartzeaz gain, molekula honek beste hainbat bide biologikoetan eragina izan dezake. Horretarako, une honetan tratatutako saguen hainbat ehunetako laginen proteomika eta transkriptomika analisi orokor bat egiten ari da, AHK2ak beste proteina batzuetan eraginik ba ote duen ezagutzeko, hots, beste bide batzuk modulatu ote dituen jakiteko, edo RyR kanalaren funtzioa hobetzeak beste hainbat mekanismo edo bidezidorretan izan ditzakeen aldaketak ezagutzeko.

Gaur egun, Duchenne muskulu-distrofia duten gaixoentzat bihotzeko arazoak izaten dira heriotzaren kausa nagusia, arnasketa arazoak zertxobait arindu dituzte eta gaueko bentilazioaren laguntzaz (Kamdar & Garry, 2016). Gainera, Becker muskulu-distrofia dutenek ere kardiomiopatia garatzen dute. Horregatik, AHK2a bihotzean eraginkorra izateak hautagai egokia bihurtzen du tratamendu berrien garapenean. Bestalde, nerbio-sistema zentraleko arazoak DMDdun gaixoen % 30ean ageri dira, eta, beraz, horri ere aurre egingo dion terapia bat izatea oso lagungarria izan daiteke bizi-kalitatea hobetzeko. Honela, giharretan hobekuntzak eragiteaz gain, bihotzeko eta garuneko arazoei aurre egingo dien hautagaia da AHK2 molekula.

Oro har, ondorio nagusia AHK2ak Duchenne gihar-distrofian potentzial terapeutikoa duela da. Esan bezala, molekula honek ez du distrofinaren gabezia ordezkatzeko, baina gabezia honek sortutako hainbat kalte hobetu ditzakela uste da. AHK2 molekulak bere dianaa den rianodina-hartzailean duen eragin zuzena baieztatu ondoren, gaur egun gehien erabiltzen diren farmakoekin terapia konbinatu bat egitea litzateke hurrengo

2. KAPITULUA

urratsa. Terapia hau mdx saguetan probatzeaz gain, Duchenne gihar-distrofia ikertzeko erabili ohi diren beste animalia-ereduekin lan egitea ere interesgarria izango litzateke entsegu-klinikoekin hasteko. Gainera, RyR estres nitro-oxidatzaile altuagatik eraldatuta dagoen hainbat gaixotasun muskular, kardiako eta neurodegeneratiboetan ere erabilgarria izan daiteke AHK2 molekula, besteak beste, sarkopenian, gutxiegitasun kardiakoan eta Alzheimerrean.

ONDORIOAK

ONDORIOAK

1. AHK1, AHK2 eta AHK3 konposatuek diana terapeutiko berdina duten S107 eta ARM210 Rycals-ek baino toxikotasun gutxiago dute zebra-arrainetan *in vivo*.
2. Duchenne muskulu-distrofiaren animalia-eredu diren *sapje* zebra-arrainak primer lehiakor hirukote batekin PCR bidez genotipatzeko metodo berri eta erraz bat diseinatu da, ondoren agarosa-gelean edo bereizmen altuko disoziazio kurbak (HRM) eginez ebatzi daitekeena.
3. AHK1 eta AHK2 medioan izan duten *sapje* zebra-arrainek dosiaren baitako hobekuntza dute indar aktiboan, fenotipo distrofikoa aldatu gabe.
4. 30 mg/kg AHK2 dosia jaso duten saguetan ez da gibelesko eta giltzurrunetako toxikotasun zantzurik behatu, eta animalien pisuan ere ez da aldaketa esanguratsurik ikusi.
5. AHK2ak barrera hematoentzefalikoa gurutzatzen du. Arratoietan erradioaktibitate bidez markatutako AHK2a garunean metatzen dela ikusi da PET tomografia bidez, odolean injektatu eta 5 minutura. Saguetan, konposatu hau garunean detektatu da aho bidez eta larruazalpeko injekzio bidez administratu eta gero. Gainera, AHK2a giharretara eta bihotzera heltzen dela baieztatu da aurreko bi moduetara administratu ondoren.
6. Mdx saguak 12 astez 30 mg/kg AHK2arekin tratatu ondoren giharren hobekuntza funtzionala aurrez 5 asteko tratamenduekin ikusitakoa baino apalagoa izan da. Euste-indarrean hobekuntzak behatu dira eta giharretako kaltearen adierazle diren serumeko CK mailan eta diafragma zein TA giharreko nukleo zentralen ehunekoan jaitsierak daude, nahiz eta estatistikoki ez diren esanguratsuak. Horrez gain, AHK2ak modu adierazgarrian babesten du diafragma distrofikoa 3 kontrakzio eszentrikok eragindako indar galeratik (% 55eko berreskuratzea).

7. 12 asteko 30 mg/kg AHK2 tratamenduak mdx saguen funtzio kardiakoa hobetzen du. Batetik, AHK2ak QTc edo bihotzak taupada baten ondoren birpolarizatzeko behar duen denbora laburtzen duela ikusi da (% 66ko berreskuratzea) elektrokardiograma bidez. Bestetik, RyR kaltzio-kanaletik *spark* edo kaltzio-irteera espontaneoak gutxitzen ditu (% 59ko berreskuratzea) eta kaltzio-birkaptazioa areagotzen du erretikulo sarkoplasmikora (% 34ko berreskuratzea).
8. 12 asteko 30 mg/kg AHK2 tratamenduak mdx saguen funtzio kognitibo aldatua normalizatzen du, besteak beste, objektu ezezagunak lurperatzeko jokaeran (% 57ko berreskuratzea) eta estres induzitu batek eragindako neurriz kanpoko erantzun defentsiboan (% 34ko berreskuratzea).

BIBLIOGRAFIA

- Aartsma-Rus, A., & van Putten, M. (2014). Assessing Functional Performance in the Mdx Mouse Model. *Journal of Visualized Experiments*, (85), 1–11. <https://doi.org/10.3791/51303>
- Abbs, S. (1996). Carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy by PCR methods. *Prenatal Diagnosis*, 16, 1187–1198.
- Aizpurua, JM, Miranda JI, Irastorza A, Torres E, Eceiza M, Sagartazu-Aizpurua M, Ferron M, Aldanondo G, Lasa-Fernández H, López de Munain A, Vallejo-Illarramendi A. (*bidalia*). Discovery of a novel family of FKBP12 reshapers and their use as calcium regulators in skeletal muscle.
- Aldanondo, G. (2017). Effect of novel ryanodine receptor modulators in mouse and human models of Duchenne muscular dystrophy. *Euskal Herriko Unibertsitatea, Tesia*.
- Allen, D., Whitehead, N. P., Allen, D. G., Whitehead, N. P., & Froehner, S. C. (2015). Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiological Reviews*, 96(December), 253–305. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2015>
- Alzualde, A., Behl, M., Sipes, N. S., Hsieh, J. H., Alday, A., Tice, R. R., ... Quevedo, C. (2018). Toxicity profiling of flame retardants in zebrafish embryos using a battery of assays for developmental toxicity, neurotoxicity, cardiotoxicity and hepatotoxicity toward human relevance. *Neurotoxicology and Teratology*, 70(October), 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.10.002>
- Anasagasti, A., Barandika, O., Irigoyen, C., Benitez, B. a., Cooper, B., Cruchaga, C., ... Ruiz-Ederra, J. (2013). Genetic high throughput screening in Retinitis Pigmentosa based on high resolution melting (HRM) analysis. *Experimental Eye Research*, 116, 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.10.011>
- Andersson, D. C., & Marks, A. R. (2011). Fixing ryanodine receptor Ca²⁺ leak - a novel therapeutic strategy for contractile failure in heart and skeletal muscle. *Drug Discov Today Dis Mech*, 7(2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2010.09.009>. Fixing
- Andersson, D. C., Betzenhauser, M. J., Reiken, S., Meli, A. C., Umanskaya, A., Xie, W., ... Marks, A. R. (2011). Ryanodine Receptor Oxidation Causes Intracellular Calcium Leak and Muscle Weakness in Aging. *Cell Metabolism*, 14(2), 196–207.

Bibliografia

<https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3182540562>.

- Baltgalvis, K.A; Call, J.A; Cochrane, G.D; Laker, R.C; Yan, Z; Lowe, D. . (2012). Exercise training improves plantarflexor muscle function in mdx mice. *Med Sci Sports Exerc*, *44*(9), 612–626. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31825703f0>.Exercise
- Banks, G. B., & Chamberlain, J. S. (2008). Chapter 9 The Value of Mammalian Models for Duchenne Muscular Dystrophy in Developing Therapeutic Strategies. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 84). [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)00609-1](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00609-1)
- Barton, E. R., & Lynch, G. (2008). Measuring isometric force of isolated mouse muscles in vitro. *Treat-Nmd.Eu*, (1d), 1–14.
- Bassett, D. I., Bryson-Richardson, R. J., Daggett, D. F., Gautier, P., Keenan, D. G., & Currie, P. D. (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development (Cambridge, England)*, *130*(23), 5851–5860. <https://doi.org/10.1242/dev.00799>
- Bellinger, A. M., Mongillo, M., & Marks, A. R. (2008). Review series Stressed out: the skeletal muscle ryanodine receptor as a target of stress. *Journal of Clinical Investigation*, *118*(2), 445–453. <https://doi.org/10.1172/JCI34006>.effects
- Bellinger, A. M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., ... Marks, A. R. (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nature Medicine*, *15*(3), 325–330. <https://doi.org/10.1038/nm.1916>
- Bellinger, A. M., Reiken, S., Dura, M., Murphy, P. W., Deng, S.-X., Landry, D. W., ... Marks, A. R. (2008). Remodeling of ryanodine receptor complex causes “leaky” channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*, 2198–2202. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711074105>
- Blat, Y., & Blat, S. (2015). Drug discovery of therapies for duchenne muscular dystrophy. *Journal of Biomolecular Screening*, *20*(10), 1189–1203. <https://doi.org/10.1177/1087057115586535>
- Bonati, U., Hafner, P., Schädelin, S., Schmid, M., Naduvilekoot Devasia, A., Schroeder, J., ... Fischer, D. (2015). Quantitative muscle MRI: A powerful surrogate outcome

- measure in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, 25(9), 679–685. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.05.006>
- Bostick, B., Shin, J. H., Yue, Y., & Duan, D. (2011). AAV-microdystrophin therapy improves cardiac performance in aged female mdx mice. *Molecular Therapy*, 19(10), 1826–1832. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.154>
- Bostick, B., Yue, Y., & Duan, D. (2010). Gender influences cardiac function in the mdx model of Duchenne cardiomyopathy. *Muscle and Nerve*, 42(4), 600–603. <https://doi.org/10.1002/mus.21763>
- Burr, A. R., & Molkentin, J. D. (2015). Genetic evidence in the mouse solidifies the calcium hypothesis of myofiber death in muscular dystrophy. *Cell Death and Differentiation*, 22(9), 1402–1412. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.65>
- Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L., ... Constantin, C. (2010a). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology*, 9(1), 77–93. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70271-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70271-6)
- Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L., ... Constantin, C. (2010b). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *The Lancet Neurology*, 9(2), 177–189. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70272-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70272-8)
- Call, J. (2015). *Aurora Muscle Contractile Function Protocol*. 13–15.
- Capogrosso, R. F., Mantuano, P., Cozzoli, A., Sanarica, F., Massari, A. M., Conte, E., ... De Luca, A. (2017). Contractile efficiency of dystrophic mdx mouse muscle: in vivo and ex vivo assessment of adaptation to exercise of functional end points. *Journal of Applied Physiology*, 122(4), 828–843. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00776.2015>
- Capogrosso, R. F., Mantuano, P., Uaesoontrachoon, K., Cozzoli, A., Giustino, A., Dow, T., ... De Luca, A. (2018). Ryanodine channel complex stabilizer compound S48168/ARM210 as a disease modifier in dystrophin-deficient mdx mice: Proof-of-concept study and independent validation of efficacy. *FASEB Journal*, 32(2), 1025–1043. <https://doi.org/10.1096/fj.201700182RRR>

Bibliografia

- Carlson, G. (2014). *Serum Creatine Kinase analysis in mouse models of muscular.* (Id), 2–7.
- Chang, N. C., Chevalier, F. P., & Rudnicki, M. A. (2016). Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity. *Trends in Molecular Medicine*, 22(6), 479–496. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.04.002>
- Cheng, H., & Lederer, W. J. (2008). Calcium Sparks. *Physiological Reviews*, 88(4), 1491–1545. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2007>
- Chris, B., & In, R. (2016). *How to Write Basic Protocols in DMC – Isometric How to Write Basic Protocols in DMC – Isometric.* 1–14.
- Ciafaloni, E. M., Fox, D. J. M., Pandya, S. P. M., Westfield, C. P. R. B., Puzhankara, S. M., Romitti, P. A. P., ... Moxley, R. T. M. (2009). Delayed Diagnosis in Duchenne Muscular Dystrophy: Data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *J Pediatr.*, 155(3), 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.bb.2017.04.008>
- Cuisset, J.-M., & Rivier, F. (2016). Manifestations centrales des dystrophinopathies. *Archives de Pédiatrie*, 22(12), 12S58-12S62. [https://doi.org/10.1016/s0929-693x\(16\)30010-0](https://doi.org/10.1016/s0929-693x(16)30010-0)
- D’Amario, D., Amodeo, A., Adorisio, R., Tiziano, F. D., Leone, A. M., Perri, G., ... Crea, F. (2017). A current approach to heart failure in Duchenne muscular dystrophy. *Heart*, 103(22), 1770–1779. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2017-311269>
- Deacon, R. M. J. (2006). Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Protocols*, 1(1), 122–124. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.20>
- Deconinck, N., & Dan, B. (2007). Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatric Neurology*, 36(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.016>
- Del Prete, D., Checler, F., & Chami, M. (2014). Ryanodine receptors: Physiological function and deregulation in Alzheimer disease. *Molecular Neurodegeneration*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-21>
- Des Georges, A., Clarke, O. B., Zalk, R., Yuan, Q., Condon, K. J., Grassucci, R. A., ... Frank, J. (2016). Structural basis for gating and activation of RyR1. *Cell*, 167(1),

- 145–157. <https://doi.org/10.3109/10253890.2015.1094689>. Post-Traumatic
- Domingues, M., Casaril, A. M., Birmann, P. T., Bampi, S. R., Lourenço, D. de A., Vieira, B. M., ... Savegnago, L. (2019). Effects of a selanylimidazopyridine on the acute restraint stress-induced depressive- and anxiety-like behaviors and biological changes in mice. *Behavioural Brain Research*, *366*, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.021>
- Doorenweerd, N., Dumas, E. M., Ghariq, E., Schmid, S., Straathof, C. S. M., Roest, A. a. W., ... Kan, H. E. (2017). Decreased cerebral perfusion in Duchenne muscular dystrophy patients. *Neuromuscular Disorders*, *27*(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.10.005>
- Doorenweerd, N., Mahfouz, A., Van Putten, M., Kaliyaperumal, R., T’Hoen, P. a. C., Hendriksen, J. G. M., ... Lelieveldt, B. P. F. (2017). Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12981-5>
- Dubach-Powell, J. (2011). Quantitative determination of muscle fiber diameter (minimal Feret’s diameter) and percentage of centralized nuclei. *Treat-NMD*, (1d), 1–16.
- Dumont, N. A., & Rudnicki, M. A. (2016). Targeting muscle stem cell intrinsic defects to treat Duchenne muscular dystrophy. *Npj Regenerative Medicine*, *1*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/npjregenmed.2016.6>
- Ervasti, J. M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1772*(2), 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.05.010>
- Fanchaouy, M., Polakova, E., Jung, C., Ogradnik, J., Shirokova, N., & Niggli, E. (2009). Pathways of abnormal stress-induced Ca²⁺ influx into dystrophic mdx cardiomyocytes. *Cell Calcium*, *46*(2), 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.06.002>
- Farini, A., Gowran, A., Bella, P., Sitzia, C., Scopece, A., Castiglioni, E., ... Torrente, Y. (2018). Fibrosis rescue improves cardiac function in dystrophin-deficient mice and Duchenne patient-specific cardiomyocytes by immunoproteasome modulation. *The American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.10.010>

Bibliografia

- Fauconnier, J., Thireau, J., Reiken, S., Cassan, C., Richard, S., Matecki, S., ... Lacampagne, a. (2010). Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(4), 1559–1564. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908540107>
- Flanigan, K. M., Dunn, D., Niederhausern, A. Von, Soltanzadeh, P., Gappmaier, E., Howard, M. T., ... Katherine, D. (2009). Mutational Spectrum of DMD Mutations in Dystrophinopathy Patients: Application of Modern Diagnostic Techniques to a Large Cohort. *Human Mutation*, *30*(12), 1657–1666. <https://doi.org/10.1002/humu.21114>.Mutational
- Gao, Q. Q., & McNally, E. M. (2015). The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Comprehensive Physiology*, *5*(3), 1223–1239. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140048>
- Gillis, J., & Carlson, G. (2008). *TREAT-NMD protocol: The recovery score to evaluate therapy efficiency in NMD: a common, quantitative and comparative scoring system.* (1d), 1–6.
- Giordano, F. J. (2005). Review series Oxygen , oxidative stress , hypoxia , and heart failure. *J. Clin. Invest.*, *115*(3), 500–508. <https://doi.org/10.1172/JCI200524408>.500
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., Andaloussi, S. El, Ezzat, K., Avril, A., ... Garcia, L. (2015). Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nature Medicine*, *21*(3), 270–275. <https://doi.org/10.1038/nm.3765>
- Grange, R. W., & Luca, A. De. (2013). Use of treadmill and wheel exercise to assess dystrophic state Official reviewer. *Neuromuscular Network*, (1d), 1–12.
- Grienberger, C., & Konnerth, A. (2012). Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, *73*(5), 862–885. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.011>
- Hathout, Y., Seol, H., Han, M. H. J., Zhang, A., Brown, K. J., & Hoffman, E. P. (2016). Clinical utility of serum biomarkers in Duchenne muscular dystrophy. *Clinical Proteomics*, *13*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12014-016-9109-x>
- Hoffman, E. P., & Schwartz, L. (1991). Dystrophin and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, *12*(3), 175–194. [https://doi.org/10.1016/0098-2997\(91\)90001-3](https://doi.org/10.1016/0098-2997(91)90001-3)

- Hoffman, Eric P., Brown, R. H., & Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, *51*(6), 919–928. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90579-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90579-4)
- Hoogerwaard, E., Bakker, E., Flppel, P., Oosterwijk, J. C., FMajoor-Krakauer, D., Leschot, N. J., ... Visser, M. (1999). Signs and symptoms of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy among carriers in the Netherlands: A cohort study. *Lancet*, *353*(9170), 2116–2119. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10028-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10028-4)
- Hu, X., & Blemker, S. S. (2015). Musculoskeletal simulation can help explain selective muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle and Nerve*, *52*(2), 174–182. <https://doi.org/10.1002/mus.24607>
- Jin-Hong Shin, Chady H. Hakim, K. Z., & Duan, D. (2012). Genotyping mdx, mdx3cv, and mdx4cv mice by primer competition PCR. *Muscle and Nerve*, *43*(2), 283–286. <https://doi.org/10.1002/mus.21873>.Genotyping
- Kamdar, F., & Garry, D. J. (2016). Dystrophin-Deficient Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, *67*(21), 2533–2546. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.02.081>
- Kawahara, G., Karpf, J. a., Myers, J. a., Alexander, M. S., Guyon, J. R., & Kunkel, L. M. (2011). Drug screening in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(13), 5331–5336. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102116108>
- Kawahara, Genri, & Kunkel, L. M. (2013). Zebrafish based small molecule screens for novel DMD drugs. *Drug Discov Today Technol*, *10*(1), 91–96. <https://doi.org/10.2217/FON.09.6>.Dendritic
- Kim, J. H., Kwak, H. B., Thompson, L. V., & Lawler, J. M. (2013). Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *34*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10974-012-9330-9>
- Kogelman, B., Khmelinskii, A., Verhaart, I., van Vliet, L., Bink, D. I., Aartsma-Rus, A., ... van der Weerd, L. (2018). Influence of full-length dystrophin on brain volumes in mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE*, *13*(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194636>
- Kossmann, C. E., & FAWCETT, D. W. (1961). The Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal and

Bibliografia

- Cardiac Muscle. *Circulation*, 24(2), 336–348.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.24.2.336>
- Lasa-Fernandez, H., Mosqueira-Martin, L., Alzualde, A., Lasa-Elgarresta, J. & Vallejo-Illarramendi, A. (*bidalia*). Genotyping sapje zebrafish by primer competition PCR.
- Lehnart, S. E., Terrenoire, C., Reiken, S., Wehrens, X. H. T., Song, L.-S., Tillman, E. J., ... Marks, A. R. (2006). Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), 7906–7910.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602133103>
- Lewon, M., Peters, C. M., Van Ry, P. M., Burkin, D. J., Hunter, K. W., & Hayes, L. J. (2017). Evaluation of the behavioral characteristics of the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy through operant conditioning procedures. *Behavioural Processes*, 142, 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.05.012>
- Li, M., Andersson-Lendahl, M., Sejersen, T., & Arner, A. (2014). Muscle dysfunction and structural defects of dystrophin-null sapje mutant zebrafish larvae are rescued by ataluren treatment. *FASEB Journal*, 28(4), 1593–1599.
<https://doi.org/10.1096/fj.13-240044>
- Lipscomb, L., Piggott, R. W., Emmerson, T., & Winder, S. J. (2016). Dasatinib as a treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 25(2), 266–274. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv469>
- Liu, X., Betzenhauser, M. J., Reiken, S., Meli, A. C., Xie, W., Chen, X., ... Marks, A. R. (2012). Role of Leaky Neuronal Ryanodine Receptors in Stress-Induced Cognitive Dysfunction. *Cell*, 150(5), 1055–1067.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.052>
- Long, K., Kostman, S. J., Fernandez, C., Burnett, J. C., & Huryn, D. M. (2019). Do Zebrafish Obey Lipinski Rules? *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10(6), 1002–1006.
<https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00063>
- Lopez, J. R., Kolster, J., Uryash, A., Estève, E., Altamirano, F., & Adams, J. a. (2016). Dysregulation of Intracellular Ca²⁺ in Dystrophic Cortical and Hippocampal Neurons. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0311-7>

- Luca, A. De. (2008). Use of grip strength meter to assess the limb strength of mdx mice. *TREAT-NMD Neuromusclar Network, DMD_M.2.2.(2.0)*, 1–11.
- Matecki, S., Jung, B., Saint, N., Reiken, S., Jaber, S., Petrof, B., ... Lacampagne, a. (2014). Leaky ryanodine receptors contribute to diaphragmatic muscle weakness during mechanical ventilation. *American Thoracic Society International Conference Abstracts*, A3885–A3885. https://doi.org/doi:10.1164/ajrccm-conference.2014.189.1_MeetingAbstracts.A3885
- Mázala, D. a. G., Pratt, S. J. P., Chen, D., Molkentin, J. D., Lovering, R. M., & Chin, E. R. (2015). SERCA1 overexpression minimizes skeletal muscle damage in dystrophic mouse models. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 308(9), C699–C709. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00341.2014>
- McDonald, C. M., Henricson, E. K., Abresch, R. T., Duong, T., Joyce, N. C., Hu, F., ... McDonald, C. M. (2018). Long-term effects of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: a prospective cohort study. *The Lancet*, 391(10119), 451–461. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32160-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32160-8)
- McGreevy, J. W., Hakim, C. H., McIntosh, M. a., & Duan, D. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Disease Models & Mechanisms*, 8(3), 195–213. <https://doi.org/10.1242/dmm.018424>
- Meeker, N. D., Hutchinson, S. A., Ho, L., & Trede, N. S. (2007). *Benchmarks Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues*. 43(5), 4–6.
- Millay, D. P., Goonasekera, S. A., Sargent, M. A., Maillet, M., Aronow, B. J., & Molkentin, J. D. (2009). Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19023–19028. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906591106>
- Moorwood, C., Liu, M., Tian, Z., & Barton, E. R. (2013). Isometric and Eccentric Force Generation Assessment of Skeletal Muscles Isolated from Murine Models of Muscular Dystrophies. *Journal of Visualized Experiments*, (71), 1–6. <https://doi.org/10.3791/50036>
- Nakamura, T., Tu, S., Akhtar, M. W., Sunico, C. R., Okamoto, S. ichi, & Lipton, S. A. (2013). Aberrant Protein S-nitrosylation in neurodegenerative diseases. *Neuron*,

Bibliografía

- 78(4), 596–614. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.005>
- Navarro-García, A., Bada-Bosch, T., Rodríguez, E., Aceves-Ripoll, J., Go, N., Kuro-o, M., & Ruilope, L. M. (2019). *Fibroblast growth factor-23 promotes rhythm alterations and contractile dysfunction in adult ventricular cardiomyocytes*. 1–12. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy392>
- Nikolaienko, R., Bovo, E., & Zima, A. V. (2018). Redox Dependent Modifications of Ryanodine Receptor: Basic Mechanisms and Implications in Heart Diseases. *Frontiers in Physiology*, 9(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01775>
- Nowak, K. J., & Davies, K. E. (2004). Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment, 5(9). <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400221>
- O'Brien, F., Venturi, E., & Sitsapesan, R. (2015). The ryanodine receptor provides high throughput Ca²⁺-release but is precisely regulated by networks of associated proteins: a focus on proteins relevant to phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, 43(3), 426–433. <https://doi.org/10.1042/BST20140297>
- Olthoff, J. T., Lindsay, A., Abo-Zahrah, R., Baltgalvis, K. A., Patrinostró, X., Belanto, J. J., ... Ervasti, J. M. (2018). Loss of peroxiredoxin-2 exacerbates eccentric contraction-induced force loss in dystrophin-deficient muscle. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07639-3>
- Pauly, M., Angebault-Prouteau, C., Dridi, H., Notarnicola, C., Scheuermann, V., Lacampagne, A., ... Fauconnier, J. (2017). ER stress disturbs SR/ER-mitochondria Ca²⁺ transfer: Implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(9), 2229–2239. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.06.009>
- Rae, M. G., & O'Malley, D. (2016). Cognitive dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy: a possible role for neuromodulatory immune molecules. *Journal of Neurophysiology*, jn.00248.2016. <https://doi.org/10.1152/jn.00248.2016>
- Raldúa, D., & Piña, B. (2014). In vivo zebrafish assays for analyzing drug toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10(5), 685–697. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.896339>
- Rando, T. A. (2001). Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: A

- “two hit” hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microscopy Research and Technique*, *55*(4), 223–235. <https://doi.org/10.1002/jemt.1172>
- Robinson, S. A., Jones, A. D., Brynildsen, J. K., Ehrlich, M. E., & Blendy, J. A. (2019). Neurobehavioral effects of neonatal opioid exposure in mice: Influence of the OPRM1 SNP. *Addiction Biology*, (June). <https://doi.org/10.1111/adb.12806>
- Roselló-Lletí, E., Carnicer, R., Tarazón, E., Ortega, a., Gil-Cayuela, C., Lago, F., ... Rivera, M. (2016). Human Ischemic Cardiomyopathy Shows Cardiac Nos1 Translocation and its Increased Levels are Related to Left Ventricular Performance. *Scientific Reports*, *6*(April), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep24060>
- Rouillon, J., Poupiot, J., Zocevic, A., Amor, F., Léger, T., Garcia, C., ... Svinartchouk, F. (2015). Serum proteomic profiling reveals fragments of MYOM3 as potential biomarkers for monitoring the outcome of therapeutic interventions in muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics*, *24*(17), 4916–4932. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv214>
- Sacco, A., Mourkioti, F., Tran, R., Choi, J., Llewellyn, M., Kraft, P., ... Blau, H. M. (2011). Short Telomeres and Stem Cell Exhaustion Model Duchenne Muscular Dystrophy in mdx/mTR Mice, *143*(7), 1059–1071. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.039.Short>
- Santulli, G., Xie, W., Reiken, S. R., & Marks, A. R. (2015). Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(36), 11389–11394. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513047112>
- Shimizu-Motohashi, Y., Komaki, H., Motohashi, N., Takeda, S., Yokota, T., & Aoki, Y. (2019). Restoring dystrophin expression in duchenne muscular dystrophy: Current status of therapeutic approaches. *Journal of Personalized Medicine*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/jpm9010001>
- Sicinski, P., Geng, Y. A. N., Ryder-cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G., & Barnardt, P. J. (1986). The Molecular Basis of Muscular Dystrophy in the mdx Mouse : A Point Mutation, *244*(21), 14–16.
- Sun, J., Xu, L., Eu, J. P., Stamler, J. S., & Meissner, G. (2003). Nitric oxide, NOC-12, and S-nitrosoglutathione modulate the skeletal muscle calcium release channel/ryanodine receptor by different mechanisms: An allosteric function for O₂ in S-nitrosylation of

Bibliografia

- the channel. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8184–8189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211940200>
- Suriyonplengsaeng, C., Dejthevaporn, C., Khongkhatithum, C., Sanpapant, S., Tubthong, N., Pinpradap, K., ... Waisayarat, J. (2017). Immunohistochemistry of sarcolemmal membrane-associated proteins in formalin-fixed and paraffin-embedded skeletal muscle tissue: A promising tool for the diagnostic evaluation of common muscular dystrophies. *Diagnostic Pathology*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13000-017-0610-y>
- Sztal, T. E., Sonntag, C., Hall, T. E., & Currie, P. D. (2012). Epistatic dissection of laminin-receptor interactions in dystrophic zebrafish muscle. *Human Molecular Genetics*, 21(21), 4718–4731. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds312>
- Terrill, J. R., Radley-Crabb, H. G., Iwasaki, T., Lemckert, F. a., Arthur, P. G., & Grounds, M. D. (2013). Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: Focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS Journal*, 280(17), 4149–4164. <https://doi.org/10.1111/febs.12142>
- Thomas, A. (2010). *NIH Public Access*. 204(2), 361–373. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1466-y>.Marble
- Tidball, J. G., & Wehling-Henricks, M. (2007). The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *Journal of Applied Physiology*, 102(4), 1677–1686. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01145.2006>
- Tinsley, J., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J. M., & Davies, K. (1998). Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nature Medicine*, 4(12), 1441–1444. <https://doi.org/10.1038/4033>
- Trebbin, A. L., & Hoey, A. J. (2009). A novel and simple method for genotyping the mdx mouse using high-resolution melt polymerase chain reaction. *Muscle and Nerve*, 39(5), 603–608. <https://doi.org/10.1002/mus.21215>
- Umanskaya, A., Santulli, G., Xie, W., Andersson, D. C., Reiken, S. R., & Marks, A. R. (2014). Genetically enhancing mitochondrial antioxidant activity improves muscle function in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42), 15250–15255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412754111>
- Vallejo-Illarramendi, A., Toral-Ojeda, I., Aldanondo, G., & López de Munain, A. (2014).

- Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 16(October), e16. <https://doi.org/10.1017/erm.2014.17>
- Van Petegem, F. (2015). Ryanodine receptors: Allosteric ion channel giants. *Journal of Molecular Biology*, 427(1), 31–53. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.004>
- Venturi, E., Galfré, E., O'Brien, F., Pitt, S. J., Bellamy, S., Sessions, R. B., & Sitsapesan, R. (2014). FKBP12.6 activates RyR1: Investigating the amino acid residues critical for channel modulation. *Biophysical Journal*, 106(4), 824–833. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.12.041>
- Verhaart, I. E. C., & Aartsma-Rus, A. (2019). Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0203-3>
- Verma, S., Anziska, Y., & Cracco, J. (2010). Review of duchenne muscular dystrophy (Dmd) for the pediatricians in the community. *Clinical Pediatrics*, 49(11), 1011–1017. <https://doi.org/10.1177/0009922810378738>
- Wang, K., Tu, Y., Rappel, W.-J., & Levine, H. (2005). Excitation-contraction coupling gain and cooperativity of the cardiac ryanodine receptor: a modeling approach. *Biophysical Journal*, 89(5), 3017–3025. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.058958>
- Waning, D. L., Mohammad, K. S., Reiken, S., Xie, W., Andersson, D. C., John, S., ... Guise, T. A. (2015). Excess TGF- β mediates muscle weakness associated with bone metastases in mice. *Nature Medicine*, 21(11), 1262–1271. <https://doi.org/10.1038/nm.3961>
- Wasala, N. B., Bostick, B., Yue, Y., & Duan, D. (2013). Exclusive skeletal muscle correction does not modulate dystrophic heart disease in the aged mdx model of Duchenne cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*, 22(13), 2634–2641. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt112>
- Waugh, T. a., Horstick, E., Hur, J., Jackson, S. W., Davidson, A. E., Li, X., & Dowling, J. J. (2014). Fluoxetine prevents dystrophic changes in a zebrafish model of duchenne muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 23(17), 4651–4662. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu185>
- Wells, D. J. (2018). Tracking progress: an update on animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Disease*, 11, 1992–1994.

Bibliografia

<https://doi.org/10.1242/dmm.035774>

- Widrick, J. J., Alexander, M. S., Sanchez, B., Gibbs, D. E., Kawahara, G., Beggs, A. H., & Kunkel, L. M. (2016). Muscle dysfunction in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *Physiological Genomics*, *48*(11), 850–860. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00088.2016>
- Yamamoto, K., Yamada, D., Kabuta, T., Takahashi, A., Wada, K., & Sekiguchi, M. (2010). Reduction of abnormal behavioral response to brief restraint by information from other mice in dystrophin-deficient mdx mice. *Neuromuscular Disorders*, *20*(8), 505–511. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.05.006>
- Yano, M., Yamamoto, T., Kobayashi, S., & Matsuzaki, M. (2009). Role of ryanodine receptor as a Ca²⁺ regulatory center in normal and failing hearts. *Journal of Cardiology*, *53*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcc.2008.10.008>
- Yoshioka, M., Okuno, T., Honda, Y., & Nakano, Y. (1980). Central nervous system involvement in progressive muscular dystrophy. *Archives of Disease in Childhood*, *55*(8), 589–594. <https://doi.org/10.1136/adc.55.8.589>
- Young, C. S., Hicks, M. R., Ermolova, N. V., Nakano, H., Jan, M., Younesi, S., ... Pyle, A. D. (2017). A single CRISPR-Cas9 deletion strategy that targets the majority of DMD patients restores dystrophin function in hiPSC-derived muscle cells. *Cell Stem Cell*, *18*(4), 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.021.A>
- Zhao, K., Shen, C., Lu, Y., Huang, Z., Li, L., Rand, C. D., ... Mei, L. (2017). Muscle Yap Is a Regulator of Neuromuscular Junction Formation and Regeneration. *The Journal of Neuroscience*, *37*(13), 3465–3477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2934-16.2017>

ESKERRAK

Zuzendariei, Ainara eta Adolfori, lan hau egiteko eman didaten aukeragatik.

Kolaboratzaileei, batez ere Madrilen estantzia egin dudan tokiko Gema Ruiz eta bere taldekideei (Laura, Alberto eta Jenni). Eta, baita ere Anders Arner (Karolinska Institutet, Estokolmo), Ainhoa Alzualde (Biobide) eta Jordi Llopi (CICbiomaGUNE).

Zerbitzuetako Claudiari (Histologia plataforma) eta Maria del Carmen Sampedrori (SGIker).

Oinarritzat izan ditudan tesien egileei: Garazi Aldanondo (bere tesiaren jarraipena izan da hau) eta Oihane Jaka (euskaraz idatzitako tesi erreferentea)

Jaione taldekideari.

Azken txanpan laguntza logistiko eta moralagatik, Garazi, Laura, Nuria eta Joni. Eta Biodonostiako lankide eta lagunei.

