



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y
FARMACOLÓGICA DEL ALCALOIDE BOLDINA EN LA
DISTROFIA MIOTÓNICA DE TIPO 1**

Memoria realizada en el programa de doctorado de Biotecnología, bajo la dirección de los doctores Arturo López Castel, Rubén Artero Allepuz y Manel Pérez Alonso, presentada por

Mari Carmen Álvarez Abril

para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valencia

Valencia, 2015

D. Arturo López Castel, Doctor en Biología y Director Científico de la empresa Valentia Biopharma S.L, D. Rubén Artero Allepuz, Doctor en Biología y Profesor Titular del Departamento de Genética de la Universidad de Valencia y D. Manuel Pérez Alonso, Doctor en Biología y Profesor Titular del Departamento de Genética de la Universidad de Valencia

CERTIFICAN:

Que Dña. Mari Carmen Alvarez Abril, licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su codirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "Caracterización de la actividad biológica y farmacológica del alcaloide boldina en la Distrofia Miotónica de tipo 1".

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para la obtención del grado de Doctora.

En Valencia, a 15 de Noviembre de 2015

Dr. Arturo López Castel Dr. Rubén Artero Allepuz Dr. Manuel Pérez Alonso

***A todos aquellos que
creyeron en este proyecto***

Agradecimientos

Gracias a mis directores Rubén y Manuel por vuestra confianza y apoyo, y sobre todo gracias a Arturo por tu especial dedicación y comprensión.

Gracias a todos lo que han pasado por Valentia Biopharma y han dejado su huella en este trabajo, y en especial gracias a Irma por estar ahí desde el principio hasta el final.

Gracias a mi familia y amigos por haberme apoyado en los momentos buenos y malos.

Gracias a Salva y a Simón.

Indice

Introducción	1
1. La Distrofia Miotónica de tipo 1: prevalencia y manifestaciones clínicas.....	1
2. Base genética de la Distrofia Miotónica de tipo 1	2
3. Mecanismo molecular de patogénesis de la DM1	4
3.1 Pérdida de función de las proteínas MBNL.....	7
3.1.1 MBNL1-3 son proteínas de dedos de zinc.....	7
3.1.2 Función molecular de las proteínas Muscleblind.....	8
3.1.3 Las proteínas Muscleblind como factores de splicing alternativo	9
3.2 Aumento de la expresión de CELF1	10
3.3 Espliceopatía	11
3.3.1 Implicación de Muscleblind y CELF1 en la espliceopatía	13
3.4 Alteración de factores de transcripción	15
3.5 Desregulación de microRNAs	16
3.6 Silenciamiento de genes por generación de fragmentos de RNA interferente	16
3.7 Traducción sin ATG asociada a repeticiones	17
3.8 Cambios epigenéticos	17
4. Tratamientos y terapias contra la DM1.....	19
4.1 Corregir o bloquear la mutación a nivel del DNA.....	19
4.2 El RNA tóxico como diana	20
4.2.1 La degradación del RNA tóxico.....	20
4.2.2 La inhibición de la unión del RNA tóxico-proteínas	22
4.3 Restaurar los niveles de proteínas de unión al RNA	23
4.4 Corregir el splicing de los transcritos alterados	24
4.5 Métodos paliativos.....	25
5. El rastreo de compuestos <i>in vivo</i> como herramienta para la búsqueda de fármacos.....	25
5.1 <i>Drosophila</i> y los rastreos de compuestos <i>in vivo</i>	26
6. <i>Drosophila</i> y el rastreo de compuestos en DM1	27
6.1 Modelos de DM1 en <i>Drosophila</i>	27
6.2 Rastreo de compuestos <i>in vivo</i> basado en un modelo espliceosensor en <i>Drosophila</i> .	30
Objetivos	35
Resultados	39

1. La boldina, identificada en un rastreo químico <i>in vivo</i> , mejora un fenotipo DM1 en moscas <i>espliceosensoras</i>	39
2. Validación de la actividad anti-CUG de la boldina en <i>Drosophila</i>	40
2.1 El aumento de los valores de luciferasa producido por la boldina no es debido a un efecto directo sobre la luciferasa, el sistema UAS/Gal4 ni sobre las repeticiones CTG.....	40
2.2 La boldina reduce la formación de foci ribonucleares en <i>Drosophila</i>	42
2.3 La boldina mejora un fenotipo funcional de longevidad en moscas modelo de DM1 .	43
3. Actividad de la boldina frente a alteraciones DM1 en líneas celulares derivadas de pacientes	44
3.1 La boldina reduce la formación de foci ribonucleares en fibroblastos DM1 humanos	44
3.2 El tratamiento con boldina no cambia la distribución de MBNL1 en el núcleo celular de mioblastos DM1	46
3.3 La boldina no revierte defectos en el splicing de diferentes transcritos en mioblastos de pacientes	48
4. Validación de la actividad de la boldina en un modelo murino de DM1	51
4.1 La boldina reduce la formación de foci ribonucleares en ratones modelo de DM1.....	51
4.2 La boldina no revierte defectos en el splicing del transcrito <i>Serca</i> en ratones modelo de DM1 HSA ^{LR}	53
4.3 La boldina no mejora defectos en el splicing del transcrito <i>Clcn1</i> en ratones modelo de DM1 HSA ^{LR}	55
4.4 La boldina disminuye el grado de miotonía en ratones modelo de DM1	56
4.5 La boldina provoca una mayor disminución de la miotonía que el antiarrítmico mexiletina en ratones DM1.....	58
4.6 La boldina reduce los niveles de miotonía en un modelo de miotonía inducida en ratón	59
5. Estudio del mecanismo de acción de la boldina	61
5.1 La boldina no se une a las repeticiones CUG <i>in vitro</i>	61
5.2 La boldina no afecta a la expresión de MBNL1 y DMPK.....	63
5.3 Estudio de la actividad de la boldina sobre diferentes canales de membrana.....	64
5.3.1 Efecto de la boldina y el mexiletina sobre corrientes de entrada a través de canales de sodio (Na ⁺) dependientes de voltaje	64
5.3.2 Efecto de la boldina y el mexiletina sobre corrientes de entrada a través de canales de calcio (Ca ²⁺) dependientes de voltaje.....	66
5.3.3 Efecto de la boldina y el mexiletina sobre corrientes de salida a través de canales de potasio (K ⁺)	67
5.3.4 Efecto de la boldina y el mexiletina en corrientes de entrada a través de receptores nicotínicos neurales	68

6. Estudios de seguridad farmacológica de la boldina	69
6.1 Estudios de seguridad cardíaca	69
6.1.1 Efecto de la boldina sobre el canal de sodio Nav1.5.....	70
6.1.2 Efecto de la boldina sobre el canal de calcio Cav1.2.....	70
6.1.3 Efecto de la boldina sobre el canal de potasio hERG	71
6.3 Determinación de la dosis tóxica de la boldina.....	71
6.3.1 La boldina no es tóxica a concentraciones eficaces en células DM1	71
6.3.2. Determinación de la toxicidad in vivo de la boldina	72
7. Propiedades farmacocinéticas de la boldina.....	73
7.1 Estudios de asociación de la boldina, ensayo de absorción in vitro.....	73
7.2 Distribución de la boldina, determinación de los niveles plasmáticos y tisulares de la boldina en ratón	74
7.3 Metabolismo de la boldina, ensayo de inhibición de citocromo P450	76
8. Estudio de la eficacia in vivo de moléculas análogas a la boldina.....	77
Discusión	81
1. La boldina mejora un fenotipo DM1 en moscas <i>esplíceosensoras</i>	81
2. El tratamiento con boldina revierte fenotipos moleculares alterados en DM1 tales como la formación de <i>foci</i> ribonucleares	83
3. La boldina reduce fenotipos funcionales de DM1.....	85
4. La boldina actúa aguas abajo en el mecanismo de patogénesis de la DM1	87
5. El mecanismo de acción de la boldina se basa en una actividad a varios niveles.....	92
6. Estudios toxicológicos y de seguridad de la boldina	96
7. Propiedades farmacocinéticas	97
8. Potencial de la boldina como molécula anti DM1	99
Conclusiones	103
Materiales y Métodos	107
I. Experimentos con <i>Drosophila</i>	107
1. Materiales	107
1.1 Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i> I.....	107
1.2 Kits I.....	107
1.3 Equipos I	107
2. Métodos	107
2.1 Preparación de medio de cultivo para llevar a cabo los experimentos en <i>Drosophila</i>	107
2.2 Ensayo de 8 puntos	108
2.2.1 Preparación de la placa de muestreo.....	108

2.2.2 Cuantificación de la actividad luciferasa en <i>Drosophila</i>	108
2.3 Estudio del efecto directo de la boldina sobre la expresión de la luciferasa y el sistema Gal4/UAS	109
2.4 Detección de los foci ribonucleares en <i>Drosophila</i>	109
2.4.1 Preparación de los viales de muestreo	109
2.4.2 Preparación de la muestra	109
2.4.3 Hibridación in situ fluorescente (FISH).....	109
2.5 Ensayo de longevidad.....	110
II. Experimentos <i>in vitro</i>	110
1. Materiales	110
1.1 RNAs II	110
2. Métodos	111
2.1 Ensayo de Retardo en Gel con sonda Fluorescente	111
2.2 Ensayos de Polarización de Fluorescencia	111
2.3 Preparación de electroforesis	112
2.3.1 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	112
2.3.2 Electroforesis de geles no desnaturalizantes de poliacrilamida	112
III. Experimentos en ratón.....	113
1. Materiales	113
1.1 Cepas de ratón III	113
1.2 Cebadores III.....	113
1.3 Kits III.....	113
2. Métodos	114
2.1 Genotipado de los ratones HSA ^{LR}	114
2.1.1 Obtención de DNA genómico.....	114
2.1.2 HSA/MSA multiplex PCR.....	114
2.1.3 Comprobación del número de repeticiones CTG en los ratones HSA ^{LR}	114
2.2 Anestesia	115
2.3 Administración de compuestos.....	115
2.4 Medida de peso	116
2.5 Eutanasia	116
2.6 Detección de foci ribonucleares en ratones HSA ^{LR}	116
2.6.1 Preparación de la muestra	116
2.6.2 Hibridación in situ fluorescente (FISH).....	116

2.6.3 Análisis de datos.....	116
2.7 Análisis del procesado alternativo de los transcritos Serca y Clcn1 mediante RT-PCR semicuantitativa.....	117
2.7.1 Extracción del RNA de músculo.....	117
2.7.2 Tratamiento con DNasa I y retrotranscripción.....	117
2.7.3 Amplificación de los transcritos por PCR	118
2.7.4 Análisis de datos.....	118
2.8 Medida de la miotonía por electromiografía (EMG).....	118
2.9 Medida del tiempo de respuesta de reposicionamiento (TRR) en un modelo de miotonía inducida químicamente en ratón	119
2.9.1 Administración de los compuestos	119
2.9.2 Medida del TRR	119
2.10 Cuantificación de la boldina en sangre y tejidos de ratón	119
IV. Experimentos en cultivo celular.....	120
1. Materiales	120
1.1 Líneas celulares empleadas IV.....	120
1.1.1 Líneas celulares modelo de DM1	120
1.1.2 Otras líneas celulares	121
1.2 Cebadores IV	121
1.3 Kits IV.....	121
2. Métodos	122
2.1 Ensayo de citotoxicidad.....	122
2.2 Detección de foci ribonucleares.....	122
2.2.1 Preparación de la muestra	122
2.2.2 Hibridación in situ fluorescente (FISH).....	122
2.2.3 Análisis de datos.....	122
2.3.2 Inmunohistoquímica	123
2.3.3 Análisis de imágenes	124
2.4 Análisis del splicing de transcritos por RT-PCR semicuantitativa.....	124
2.4.1 Administración del compuesto	124
2.4.2 Extracción de RNA total.....	124
2.4.3 Amplificación de los transcritos por PCR	124
2.4.4 Análisis de datos.....	124
2.5 Determinación de los niveles expresión de MBNL1 y DMPK mediante qRT-PCR	125
2.6 Estudios electrofisiológicos de diferentes canales de membrana.....	125

2.6.1 Preparación y cultivo de las células cromafines de la glándula adrenal bovina ..	125
2.6.2 Estudios electrofisiológicos	125
2.7 Estudios de seguridad cardíaca	126
2.7.1 Canal de sodio Nav1.5	126
2.7.2 Canal de calcio Cav1.2	127
2.7.3 Canal de potasio hERG	128
2.8 Estudios de absorción in vitro; ensayo de permeabilidad A-B.....	128
2.9 Estudios de metabolismo; ensayo de inhibición del citocromo P450.....	129
Bibliografía	133

Introducción

Introducción

1. La Distrofia Miotónica de tipo 1: prevalencia y manifestaciones clínicas

La Distrofia Miotónica de tipo 1 o enfermedad de Steinert (DM1, OMIM #160900) fue descrita en 1909 por el médico alemán Hans Steinert (1875-1911). Esta enfermedad está incluida dentro del grupo de enfermedades raras, que son aquellas que afectan al menos a 1 de cada 2.000 personas en Europa. Tradicionalmente la prevalencia de la DM1 en Europa y Norteamérica se ha cifrado en 1 cada 8.000 nacimientos vivos (Harper, 2001), aunque esta varía según las diferentes regiones geográficas y poblaciones étnicas. Regiones como Quebec en Canadá y el País Vasco en España tienen una prevalencia de hasta 10 veces mayor que la media mundial (López de Munain *et al.*, 1993; Mathieu y Prévost, 2012) debido posiblemente a la presencia de un gen fundador en una comunidad de pequeño tamaño (Yotoba *et al.*, 2005). Aun estando dentro del grupo de las enfermedades raras, la DM1 es el tipo de distrofia muscular más común en la población adulta, y la segunda forma más habitual de enfermedad del músculo esquelético tras la Distrofia Muscular de Duchenne.

Concretamente, la DM1 es una enfermedad multisistémica de expresividad clínica altamente variable (Tabla I1)(Harper, 2001). Esta enfermedad debe su nombre a dos de sus principales síntomas, la miotonía o rigidez muscular específica tras una contracción voluntaria, y la distrofia, nombre que recibe cualquier trastorno muscular hereditario en el que el músculo sufre un deterioro progresivo. Sus síntomas afectan principalmente al músculo, viéndose especialmente afectadas la musculatura distal en las extremidades inferiores y la musculatura facial (Gagnon *et al.*, 2007; Harper, 2001). La rigidez presente en los músculos faciales puede llevar a los pacientes a sufrir problemas de habla y pérdida de expresión facial, así mismo la debilidad de los músculos en las muñecas y tobillos provoca torpeza motora e inestabilidad a la hora de iniciar la marcha. Otros músculos disfuncionales en DM1 son los involucrados en la respiración y en la deglución. Dado que los principales músculos implicados en la marcha están moderadamente afectados, generalmente la mayoría de los pacientes nunca necesitará una silla de ruedas para su uso continuo, sin embargo, la debilidad de otros músculos puede llegar a producir serios inconvenientes en momentos en los la movilidad general está todavía razonablemente conservada (Harper, 2001).

La DM1 no es sólo una enfermedad muscular, si no que los síntomas implican a prácticamente todos los órganos y sistemas, siendo las manifestaciones clínicas muy variables entre pacientes. Entre ellos destacan las alteraciones en el Sistema Nervioso Central, como la somnolencia diurna, y los trastornos de la personalidad como la falta de iniciativa.

Otros trastornos típicos de la enfermedad son las cataratas iridiscentes, trastornos digestivos, resistencia a la insulina, atrofia gonadal, y calvicie frontal en los varones (Meola *et al.* 2014). Además, la mayoría de los pacientes sufre trastornos cardíacos tales como el prolapso de la válvula mitral, así como arritmias cardíacas, que en ocasiones pueden llegar a ocasionar la muerte súbita del paciente (Meola *et al.*, 2014).

Aunque los problemas musculares, como la debilidad, son altamente invalidantes en pacientes, no hay que menospreciar los problemas cognitivos que les llevan a tener cambios en la personalidad, inactividad, apatía y rasgos paranoides (Peric *et al.*, 2014). Por último, cabe destacar que la esperanza de vida de los pacientes de DM1 se encuentra reducida siendo la principal causa de muerte el fallo respiratorio y cardíaco.

Tejido implicado	Problema general de salud
Muscular	Debilidad en la musculatura distal (cuello, muñecas, manos y tobillos), miotonía, fatiga, ptosis facial, problemas de deglución, dolor muscular
Respiratorio	Infecciones pulmonares frecuentes, insuficiencia respiratoria
Cardíaco	Defectos en la conducción cardíaca
Gastrointestinal	Disfagia, estreñimiento o diarrea, oclusión intestinal, transaminasas elevadas
CNS y sistema cognitivo	Déficits del lóbulo fronto-parietal, trastornos de la personalidad (psicosis, depresión, ansiedad, falta de iniciativa), hipersomnolencia diurna, apnea del sueño, leve atrofia cortical, cambios en la materia blanca
Oculares	Cataratas iridiscentes
Endocrino	Hiperinsulinemia, disfunción tiroidea, diabetes melitus, atrofia testicular, alteraciones en la homeostasis del calcio, infertilidad

Tabla I1. Principales síntomas de la Distrofia Miotónica de tipo 1 (Harper, 2001)

2. Base genética de la Distrofia Miotónica de tipo 1

La DM1 es una enfermedad genética, con un patrón de herencia autosómico dominante, de penetrancia alta y expresividad variable. La causa genética de la DM1 se debe a la existencia de una mutación dinámica en la región 3' no traducida (UTR) del gen *proteína quinasa de la distrofia miotónica (DMPK, Entrez #1760)*, localizada en la región cromosómica 19q13.2-q13.3 (Brook *et al.*, 1992). Esta mutación consiste en una expansión anormal de repeticiones del trinucleótido CTG. Los individuos sanos pueden tener entre 5 y 35 copias de este trinucleótido en sangre, mientras que en los pacientes el número de repeticiones es mayor de 50 llegando incluso a miles de copias. El número de tripletes CTG correlaciona de forma aproximada con la gravedad de los

síntomas y la edad de aparición (Harley *et al.*, 1993), así la DM1 se clasifica en diferentes subtipos en función de la edad de inicio y el número de repeticiones (Tabla 12). Se habla de DM1 clásica cuando el paciente tiene un número de repeticiones inferior a 1.000 y la aparición de los primeros síntomas se da en la segunda década de vida. En los casos en los que los síntomas clínicos aparecen en el momento del nacimiento se habla de DM1 congénita (DMC), siendo el número de repeticiones superior a 1.000 y los síntomas de especial gravedad.

Subtipo	Síntomas Clínicos	Repeticiones CTG	Edad de aparición
Premutación	Asintomático	35-49	-----
Leve	Cataratas, miotonía leve	50-150	20 a 70 años
Clásica	Debilidad, miotonía, cataratas, arritmias cardíacas, problemas respiratorios, calvicie	100-1.000	10 a 30 años
Congénita	Hipotonía infantil, defectos respiratorios, déficit intelectual	>1.000	Nacimiento a 10 años

Tabla 12. Subtipos de Distrofia Miotónica de tipo 1

Una de las características típicas de la DM1 es el fenómeno de la anticipación genética; el número de repeticiones CTG y la gravedad de los síntomas clínicos aumentan de generación en generación, siendo la edad de aparición cada vez más temprana con las sucesivas generaciones. Este fenómeno es debido a la inestabilidad de las repeticiones en la línea germinal de los progenitores (Pearson *et al.*, 2005). Además de esta inestabilidad germinal, los pacientes presentan inestabilidad somática, por lo que el número de repeticiones en un individuo varía en función del tejido (Thornton *et al.*, 1994) y la edad (Martorell *et al.*, 1997).

El gen *DMPK* codifica para una serina/treonina kinasa cuya función exacta todavía se desconoce (Timchenko *et al.*, 1995). Las proteínas DMPK son homólogas de las kinasas MRCK (o kinasa de unión a Cdc42) y ROK/ROCK (o kinasa de Rho) (Kaliman y Llagostera, 2008) ambas implicadas en la reorganización del citoesqueleto, el tráfico intracelular y el metabolismo de proteínas. Además, se ha descrito que DMPK fosforila a la proteína CELF1 *in vitro* (Roberts *et al.*, 1997), un factor de procesado alternativo (en adelante *splicing*) implicado en la regulación de transcritos alterados en pacientes de DM1 (ver apartado 3.2 de la Introducción). Se han identificado dos isoformas de DMPK, la más abundante, de 80 kDa, se expresa mayormente en el músculo esquelético, mientras que la segunda isoforma, de 70 kDa, se expresa en las células de Purkinje del corazón (Maeda *et al.*, 1995). A pesar de que la función fisiológica exacta de esta proteína se desconoce, en el corazón, DMPK está implicada en la homeostasis del calcio y la respuesta al receptor β - adrenérgicos, relacionándose así con los fallos a nivel cardíaco observados en pacientes (Llagostera *et al.*, 2012). También se ha

descrito su implicación en la translocación de la insulina y el IGF-1 a la membrana plasmática, lo que podría implicar a DMPK con la insuficiencia insulínica observada en pacientes (Llagostera et al., 2007). Por último, cabe destacar el papel de esta proteína en la estabilización de la envoltura nuclear, proceso clave para la determinación de la estructura nuclear, la regulación génica y la función muscular (Harmon et al., 2011).

Además de la DM1, se conoce otro tipo de Distrofia Miotónica de comienzo en edad adulta: La Distrofia Miotónica de tipo 2 (DM2 o PROMM, OMIM #602668). La causa genética de la DM2 se debe también a la expansión de una secuencia repetida, en este caso del tetranucleótido CCTG en el intrón 1 del gen *CNBP1* (*celular nucleic acid binding protein 1*, Entrez #7555), siendo patogénicas un número de copias de entre 75-11.000 (Liquori et al., 2001). La prevalencia de la DM2 es menor que la de la DM1 y está estimada en 1 cada 100.000 individuos en Europa con una sintomatología similar a la descrita en la DM1 aunque con un cuadro clínico más leve.

Cabe destacar que además de DM1 y DM2, la expansión de secuencias repetidas cortas en genes concretos es la causa de al menos 40 enfermedades (Pearson et al., 2005) como FXTAS, SCA8, SCA10, SCA12 y HDL2 (Ranum y Cooper, 2006; Rudnicki et al., 2007; Li et al., 2008; Daughters et al., 2009), algunas de ellas con una alta prevalencia, como la Distrofia Corneal Endotelial de Fuchs (Du et al., 2015).

3. Mecanismo molecular de patogénesis de la DM1

Con el descubrimiento de las expansiones CTG como causa de la DM1, se propusieron una serie de hipótesis acerca de los posibles mecanismos de patogénesis de la enfermedad. Una de estas hipótesis se centró en la haploinsuficiencia de *DMPK* como causa, donde la inhibición de la expresión de la proteína DMPK causada por las repeticiones expandidas se postulaba como el mecanismo de patogénesis causante de la enfermedad. Sin embargo, ratones *knockout* para *Dmpk* muestran una sintomatología muy débil de la enfermedad (Jansen et al., 1996; Reddy et al., 1996) y además existen contradicciones a la hora de confirmar la reducción de los niveles de DMPK en pacientes (Narang et al., 2000). Estos resultados sugieren que aunque DMPK puede estar implicada en ciertos aspectos de la sintomatología de la DM1, la haploinsuficiencia no parece ser la causa principal de la enfermedad.

Una segunda hipótesis propuesta se basaba en que la presencia de las repeticiones CUG afecta a la expresión de los genes adyacentes a *DMPK*. En los pacientes de DM1, la expresión de *SIX5* adyacente al alelo mutante de *DMPK* está reducida, pero no así la expresión del alelo contiguo al alelo *DMPK* salvaje (Thornton et al., 1997). Sin embargo, los ratones *knockout* para *Six5* desarrollan cataratas no relacionadas con la DM1 y no muestran ningún síntoma muscular (Sarkar et al., 2000; Klesert et al., 2000)

por lo que las alteraciones en la expresión de genes adyacentes no parecen ser la causa primaria de la enfermedad.

Existen numerosas evidencias que posicionan la ganancia de función tóxica del RNA como el mecanismo de patogénesis causante de la DM1 (Michalowski *et al.*, 1999; Mankodi *et al.*, 2003). El RNA portador de la expansión de CTGs se pliega sobre sí mismo a nivel de las repeticiones formando una horquilla de doble cadena que interfiere con el procesado de sus propios transcritos, de transcritos diferentes o en la interacción con proteínas de unión al RNA. Esta horquilla de doble cadena y las proteínas con las que interacciona quedan retenidas en el núcleo formando agregados ribonucleares denominados *foci* (Michalowski *et al.*, 1999; Mooers *et al.*, 2005).

Los modelos animales han sido una herramienta fundamental para evidenciar la toxicidad del RNA portador de las repeticiones expandidas. El primer modelo murino, descrito por Mankodi y colaboradores se basó en la expresión de 250 repeticiones CTG únicamente en el músculo esquelético (HSA^{LR}, de Human Skeletal Actin Long Repeats)(Mankodi *et al.*, 2000). Estos ratones presentan *foci* ribonucleares, miotonía, miopatía y defectos moleculares presentes en los pacientes, demostrando la toxicidad de las repeticiones CTG. Sin embargo, no reproducen aspectos clave de la DM1 como la inestabilidad somática e intergeneracional, o la debilidad y el desgaste muscular (Wheeler, Krym *et al.*, 2007). Otro modelo murino que ha contribuido a establecer el mecanismo de patogénesis de la DM1 es el DMSXL, denominado así por tener un número mayor de 1.300 repeticiones CTG. En este modelo, las repeticiones CTG se encuentran en su contexto humano (45 kb de la región genómica que rodea a las repeticiones). Estos ratones tienen la ventaja de modelizar aspectos de la enfermedad en diferentes tejidos, detectándose *foci* en músculo esquelético, corazón y sistema nervioso central, además de reproducir la inestabilidad somática e intergeneracional observada en pacientes (Huguet *et al.*, 2012). Además, estos ratones muestran un fenotipo que combina una alta mortalidad, retraso del crecimiento, alteraciones moleculares y defectos musculares a nivel histológico y funcional (Gomes-Pereira *et al.*, 2007). El estudio de estos ratones DMSXL permitió la identificación y caracterización de las alteraciones en el SNC en DM1 (Panaite *et al.*, 2011). Además de los modelos murinos, otros modelos generados en *Drosophila* confirmaron la toxicidad de las repeticiones independientemente de *DMPK* (de Haro *et al.*, 2006; Garcia-López *et al.*, 2008). Cabe destacar, que modelos generados en *Drosophila*, gracias entre otras cosas a su pequeño tamaño, se han empleado en la búsqueda de nuevas terapias frente a esta enfermedad mediante su uso en el rastreo masivo de compuestos.

La presencia de las repeticiones tóxicas en el núcleo celular lleva a la desregulación de factores nucleares que participan en el *splicing* alternativo de mensajeros. Entre los factores de *splicing* alterados destacan dos familias de proteínas; las proteínas de la familia Muscblind MBNL1-3 (del inglés *Muscblind-like proteins 1-3*) y CELF1

(CUGBP-ETR-3 like factor 1) (Kanadia, Urbinati *et al.*, 2003; Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). La desregulación de las funciones de ambas proteínas provocada por las repeticiones, causa la alteración del *splicing* de numerosos genes (Fig. I1).

Retenidas en el núcleo, las repeticiones CUG provocan de manera directa o indirecta un gran número de alteraciones, algunas de las cuales pueden relacionarse directamente con los síntomas de la enfermedad. Sin embargo en los últimos años se han descrito numerosas alteraciones tanto ligadas directamente a la expresión del RNA tóxico, como asociadas a la presencia de estas expansiones a nivel de DNA, generándose un esquema de la enfermedad más complejo.

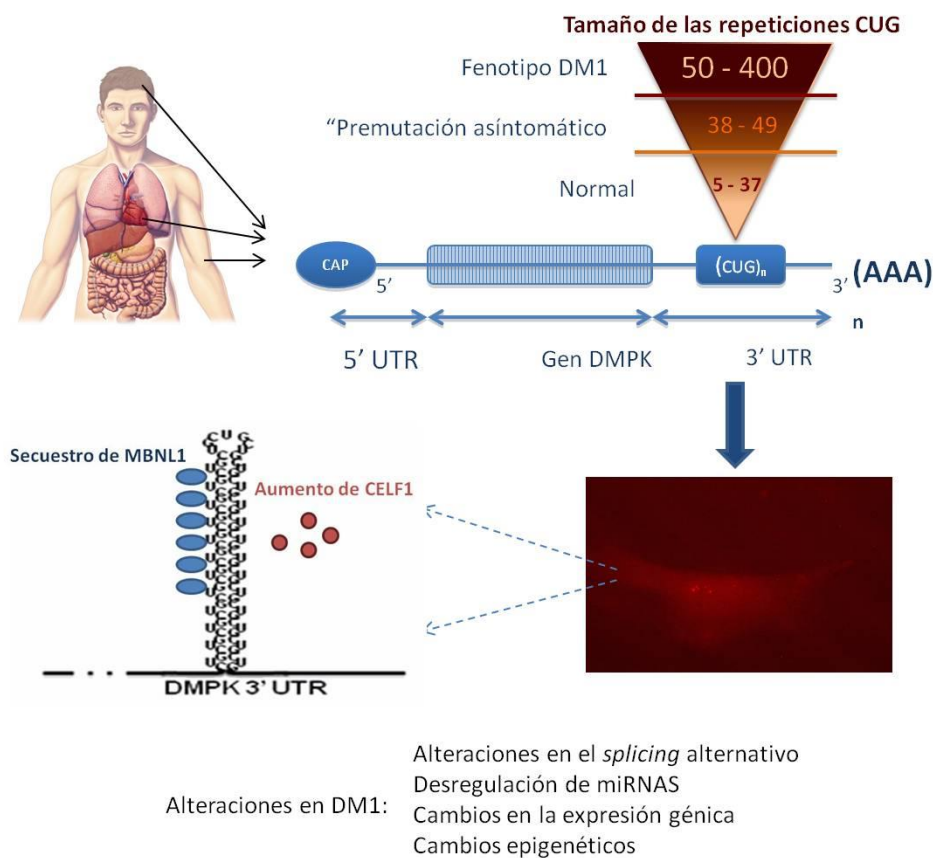


Figura I1. Modelo esquemático de la mutación responsable de la patogénesis en DM1. La DM1 es una enfermedad multisistémica que afecta a diferentes órganos como cerebro, corazón y musculatura. Los transcritos DMPK con repeticiones CUG forman horquillas de RNA que se acumulan en el núcleo en forma de *foci* secuestrando diferentes proteínas nucleares. Tanto la falta de función de MBNL1 como la activación de CELF1 provocadas por las repeticiones causan alteraciones en el *splicing* alternativo y en la traducción y regulación de numerosos pre-mensajeros. La presencia de las repeticiones tóxicas propicia de alguna manera cambios en la expresión génica y cambios epigenéticos además de la desregulación de miRNAs y la activación de la vía de traducción RAN. Figura basada en Chau *et al.*, 2014

Entre las alteraciones observadas en DM1, bien sean debidas directamente al RNA tóxico o a las expansiones a nivel del DNA, destacan:

3.1 Pérdida de función de las proteínas MBNL

Las proteínas MBNL fueron inicialmente caracterizadas como factores relacionados con la patogénesis de la DM1 pero posteriormente mostraron ser reguladores directos del *splicing* alternativo. (Kanadia, Johnson *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2004). En humanos, al igual que en la mayoría de vertebrados, existen 3 genes parálogos diferentes (MBNL1, MBNL2 y MBNL3, cada uno de los cuales codifica para 7, 2 y 6 isoformas respectivamente. MBNL1 y MBNL2 se expresan en cerebro, corazón, músculo e hígado entre otros mientras que MBNL3 se expresa principalmente en la placenta (Kanadia, Johnstone *et al.*, 2003). Existe una correlación directa entre aquellos tejidos donde MBNL1 se expresa mayormente y los tejidos más afectados en pacientes de DM1 (Kanadia, Urbinati *et al.*, 2003). Además el papel clave de las proteínas MBNL ha sido demostrado en diferentes modelos animales de la enfermedad. Ratones *knockout* para *Mbnl1* reproducen fenotipos de la enfermedad como miotonía, miopatía, cataratas y alteraciones en el *splicing* (Kanadia, Johnstone *et al.*, 2003), que son revertidos mediante la sobreexpresión de MBNL1 (Kanadia *et al.*, 2006). Así mismo la sobreexpresión de MBNL1 revierte los fenotipos musculares y en ojo observados en *Drosophila* (de Haro *et al.*, 2006; Garcia-Lopez *et al.*, 2008). Ratones deficientes para *Mbnl2* desarrollan miotonía y miopatía lo que indica que es probable que MBNL2 tenga tanto funciones redundantes como funciones independientes a las de MBNL1 (Hao *et al.*, 2008). De hecho, ratones *knockout* para *Mbnl2* desarrollan alteraciones del sistema nervioso central asociadas a la DM1 como son las alteraciones en el sueño REM, la somnolencia diurna y el déficit de memoria espacial, así como alteraciones en el *splicing* de transcritos en el hipocampo (Charizanis *et al.*, 2012).

3.1.1 MBNL1-3 son proteínas de dedos de zinc

Las proteínas Muscleblind fueron descritas por primera vez hace cerca de dos décadas (Begemann *et al.*, 1997; Artero *et al.*, 1998). Aunque inicialmente fueron identificadas en *Drosophila*, se han descrito proteínas Muscleblind en organismos que van desde nematodos (*Caenorhabditis elegans*) hasta vertebrados.

Una característica común a todas las proteínas pertenecientes a la familia Muscleblind es la presencia de dedos de zinc en su extremo N terminal (Pascual *et al.*, 2006; Warf y Berglund, 2007). En mamíferos, las proteínas MBNL contienen cuatro motivos de dedos de zinc que son los responsables de la unión de MBNL1 a la horquillas de (CUG)RNA. Estos dedos de zinc del tipo CCCH coordinan a los átomos de zinc

provocando una conformación estructural que permite la unión al RNA de forma específica de secuencia. Además de al RNA de doble cadena, tanto los dedos de zinc de MBNL1 humano como *mbl* de *Drosophila* pueden unirse a secuencias de RNA de cadena simple *in vitro* (Ho *et al.*, 2004; Goers *et al.*, 2008) y al DNA (Kino *et al.*, 2004). El mecanismo de reconocimiento de MBNL1 a sus dianas depende de la presencia de desapareamientos pirimidina-pirimidina y de la localización de los pares C-G y G-C en la horquilla de RNA. Los primeros estudios realizados en este campo mostraron que MBNL1 se une fuertemente a repeticiones CUG, CCUG y CAG (Kino *et al.*, 2004). Posteriormente, estudios de deleciones en transcritos *CTNT* definieron la secuencia YGCU(U/G)Y (donde Y=U o C) contenida en el pre-mRNA como el motivo de unión a MBNL1 (Teplova y Patel, 2008; Goers *et al.*, 2010).

3.1.2 Función molecular de las proteínas Muscleblind

Las proteínas MBNL1-3, además de tener un patrón de expresión distinto, no cumplen las mismas funciones. Así, algunos trabajos han implicado a *MBNL1* como promotor de la diferenciación muscular, ya que concentraciones elevadas de las proteínas MBNL promueven la diferenciación mediante cambios en el metabolismo de determinados mRNAs diana (Konieczny *et al.*, 2015). Estudios recientes han propuesto la implicación de la proteína MBNL3 en la regeneración muscular mediante la activación de células musculares satélite y la diferenciación miogénica producida tras una lesión muscular (Poulos *et al.*, 2013). Los estudios *in vivo* en organismos modelo han confirmado que las proteínas Muscleblind tienen un papel crucial en el desarrollo del músculo. En *Drosophila*, los mutantes de *mbl* mueren como larva de primer estadio (L1) en el interior del huevo al ser incapaces de eclosionar. A nivel ultraestructural, en estos individuos los sarcómeros musculares muestran un fenotipo típico de músculo hipercontraído con desorganización de bandas Z y pérdida de bandas I (Artero *et al.*, 1998). Además, el único regulador transcripcional de *mbl* descrito hasta la fecha es la proteína Mef2 (del inglés myocyte enhancing factor), un activador clave durante la miogénesis (Artero *et al.*, 1998).

A parte de su papel en el desarrollo del músculo, las proteínas MBNL1 y MBNL2 están implicadas en la reprogramación de las células madre embrionarias. La sobreexpresión de MBNL1 y MBNL2 provoca un cambio en el *splicing* de estas células pasando de un patrón de células pluripotentes hacia uno más característico de células diferenciadas (Han *et al.*, 2013). También se ha visto que MBNL1 juega un papel importante en la diferenciación y proliferación normal de los eritrocitos en ratón mediante la regulación del *splicing* de genes diana como *Ndel1* o *Mff* (Cheng *et al.*, 2014).

Conjuntamente con su papel en el núcleo como regulador de *splicing*, las proteínas MBNL se expresan en el citoplasma donde regulan la estabilidad (Osborne *et al.*, 2009;

Du *et al.*, 2010) y la localización de los mRNAs (Fig. 12). Se sabe que MBNL2 participa en la localización subcelular de transcritos como la β -actina y la integrina $\alpha 3$ desde el núcleo a las adhesiones focales en la periferia celular para su traducción (Adereth *et al.*, 2005).

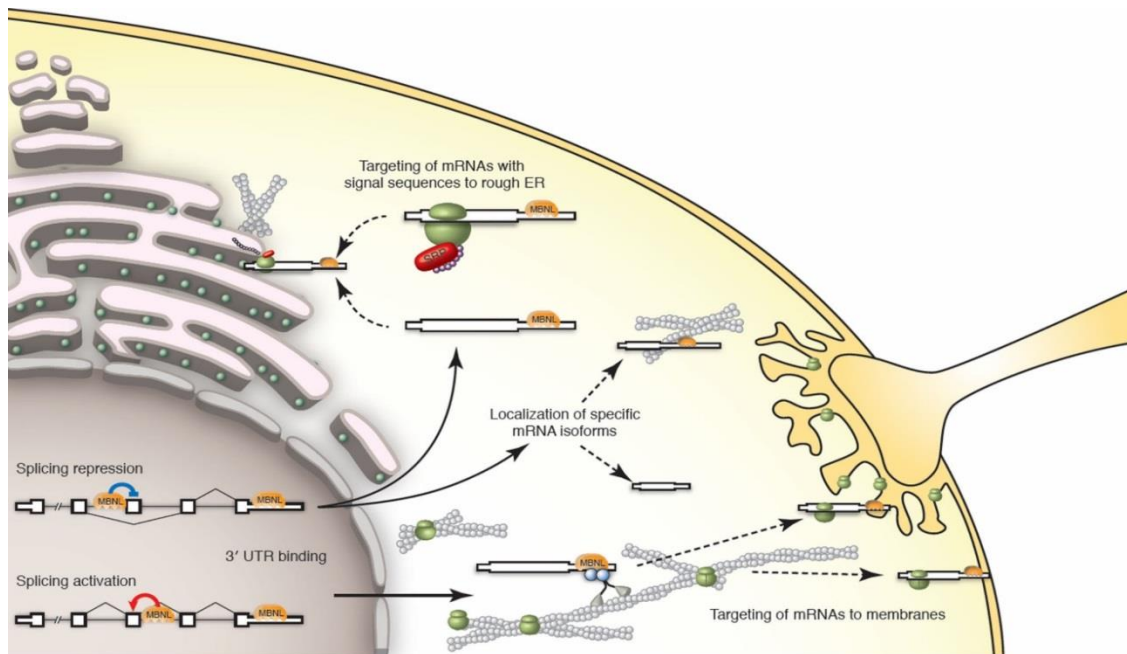


Figura 12. Funciones nucleares y citoplasmáticas de MBNL. MBNL reprime o activa el *splicing* de transcritos en el núcleo. En el citoplasma la unión de MBNL a los extremos 3'UTRs dirige el transporte de los transcritos hacia el retículo endoplasmático rugoso. Por otro lado, los transcritos pueden ser dirigidos hacia la membrana para su traducción localizada, supuestamente mediante interacción con transportadores moleculares del citoesqueleto. Por último MBNL podría mediar la localización isoforma-específica de mRNA. Figura tomada de Wang *et al.*, 2012.

Por último, en células derivadas de pacientes de DM1 se ha visto que la localización subcelular de MBNL1 podría estar implicada en el desarrollo del cristalino, lo que se relaciona con las características cataratas que sufren los pacientes. Esta implicación parece estar mediada por la regulación de MBNL1 del metabolismo del mRNA (Coleman *et al.*, 2014).

3.1.3 Las proteínas Muscleblind como factores de *splicing* alternativo

La función más estudiada de las proteínas MBNL es su papel como factores de *splicing* específicos de tejido en el músculo esquelético, corazón y sistema nervioso. Comparaciones directas de cambios en el transcriptoma entre ratones HSA^{LR} y *knockout* de *Mbnl* mostraron que la pérdida de función de *Mbnl* explica el 80% del total de los transcritos alterados por la presencia de las repeticiones CUG expandidas (Du *et al.*, 2010). MBNL1 regula principalmente el cambio en el *splicing* que tiene lugar

en la transición de feto a adulto en el tejido muscular, mientras que MBNL2 realiza un papel similar en el cerebro (Paulos *et al.*, 2013). Además, el papel de estas dos proteínas en la regulación del *splicing* parece ser intercambiable (Wang *et al.*, 2012). A nivel muscular, MBNL1 regula el *splicing* de transcritos que codifican proteínas estructurales del sarcómero (ZASP, Titina, cTNT y TNNT3), de adhesión celular (proteína LIM 1 de unión a Actina, Nrap y Fibronectina) o de excitación y contracción muscular (SERCA1, CIC-1 y RyR) y señalización (INSR, Sorbs1 y MTMR1), todas ellas implicadas en DM1 (Ho *et al.*, 2004; Hino *et al.*, 2007; Warf y Berglund, 2007). Ratones *knockout* de Mbnl2 muestran varias alteraciones observadas en pacientes de DM1 a nivel del sistema nervioso central y la pérdida de MBNL2 en el cerebro desencadena la desregulación de diversos transcritos implicados en DM1 (Paulos *et al.*, 2013). El papel de MBNL3 en la regulación del *splicing* de transcritos no es tan evidente ya que aunque parece no actuar sobre el *splicing* alternativo *in vivo*, a si es capaz de promover el *splicing* de determinados exones *in vitro* (Ho *et al.*, 2004).

Las proteínas Muscleblind pueden desempeñar un papel tanto activador como represor del *splicing* alternativo de exones específicos, de hecho, estudios en ratón mostraron que cerca de la mitad de los exones regulados por Mbnl1 son incluidos mientras que la otra mitad son excluidos (Du *et al.*, 2010).

3.2 Aumento de la expresión de CELF1

Tal y como se ha descrito anteriormente, las repeticiones tóxicas provocan la desregulación de CELF1 (CUGBP-ETR-3 like factor 1), una proteína multifuncional que actúa a nivel del núcleo y el citoplasma regulando el *splicing*, la estabilidad y la traducción de sus RNA diana (Barreau *et al.*, 2006). Al contrario de lo que sucede con las proteínas MBNL, CELF 1 no colocaliza con los *foci* ribonucleares en células DM1 (Mankodi *et al.*, 2003), si no que al contrario, los niveles de CELF1 se encuentran aumentados en mioblastos, músculo esquelético y corazón de pacientes (Savkur *et al.*, 2001; Timchenko *et al.*, 2001).

A pesar de no conocerse el mecanismo exacto por el que la presencia de las repeticiones CTG activa a *CELF1*, se sabe que el aumento de los niveles de CELF1 en DM1 se da mediante dos mecanismos independientes: por mediación de la proteína PKC (proteína quinasa C), la cual hiperfosforila a CELF1 haciéndola más estable (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007); y mediante la disminución de los niveles mir-23a/B, un microRNA que suprime la traducción de *CELF1* en músculo cardíaco (Kalsotra *et al.*, 2014). Otra proteína implicada en las alteraciones de CELF1 en DM1 es la proteína Akt (proteína quinasa B), la cual regula su distribución núcleo-citoplasmática (Huichalaf *et al.*, 2007). La activación de la ruta Akt aumenta la fosforilación de CELF1 alterando la diferenciación de mioblastos a miotúbulos en DM1 (Salisbury *et al.*, 2008). Así mismo,

una incorrecta fosforilación podría ser la causa de la deslocalización de CELF1 observada en pacientes de DM1 y en ratones *knockout* para *Dmpk* (Roberts *et al.*, 1997).

La implicación de CELF1 en la patogénesis de la DM1 ha quedado demostrada tras la sobreexpresión de esta proteína en modelos murinos, donde se observaron alteraciones en el *splicing* como las descritas en DM1 (Ho, Bundman *et al.*, 2005) así como alteraciones histopatológicas en músculo esquelético y cardíaco, pérdida de musculatura y letalidad prematura. Dado que en ratones deficientes de *Mbnl1* no se observa pérdida de musculatura, el aumento de los niveles de CELF1 podría relacionarse con la pérdida de masa muscular observada en DM1. También se ha descrito la implicación de esta proteína en la regulación de la cardiogénesis (Blech-Hermoni *et al.*, 2013) y en el desarrollo de la función neural (Ladd, 2013). Además de su papel en el núcleo como factor de *splicing*, CELF1 también tiene otras funciones en el citoplasma, donde participa en la estabilidad y la traducción de RNA mensajeros. Por último, las alteraciones a nivel proteico y de mRNA observadas en DM1 apoyan la idea de que la perturbación de las funciones citoplasmáticas de CELF1 contribuye al mecanismo de patogénesis de la DM1 (Timchenko *et al.*, 2010).

3.3 Espliceopatía

La presencia de las repeticiones tóxicas en el núcleo celular lleva a la desregulación de factores nucleares que participan en el *splicing* alternativo de mensajeros. Las repeticiones CUG secuestran factores de *splicing*, que en lugar de hacer su función normal en la célula, se unen a las horquillas CUG de doble cadena, quedando así retenidos en el núcleo y formando los denominados *foci* ribonucleares (Fig. I3). Tal y como se ha descrito anteriormente, se conocen varias proteínas capaces de unirse a las repeticiones tóxicas entre las que se encuentran las proteínas hnRNP, (Paul *et al.*, 2006) y las proteínas de la familia Muscleblind MBNL1-3 (del inglés *Muscleblind-like proteins 1-3*) (Miller *et al.*, 2000; Fardaei *et al.*, 2002; Mankodi *et al.*, 2003; Kino *et al.*, 2004), siendo estas últimas de especial relevancia para la patogénesis de la enfermedad.

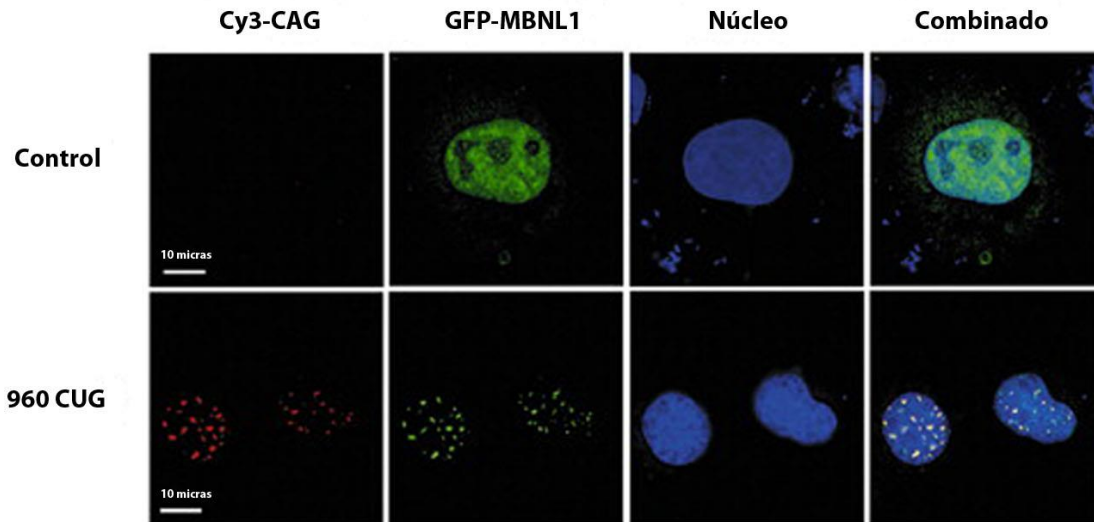


Figura 13. Secuestro de MBNL1 en inclusiones nucleares de repeticiones CUG. Las repeticiones CUG (Cy3-CAG) forman agregados en los núcleos de células COSM6 transfectadas con DMPK conteniendo 960 (960 CUG) o 0 (control) repeticiones CTG. La cotransfección con MBNL1 marcado con GFP (GFP-MBNL1) muestra la colocalización (combinado) de esta proteína con los *foci* nucleares. Figura modificada de Ho et al., 2005 (Ho, Savkur, et al., 2005).

Debido a este secuestro, los pacientes presentan alteraciones en *splicing* alternativo de al menos 150 transcritos (Tabla I2; Du *et al.*, 2009), lo que llevó a acuñar el término *esplíceopatía*, para la cual la Distrofia Miotónica de tipo 1 es el primer ejemplo descrito. Los sucesos de *splicing* alterados identificados hasta la fecha se basan en la presencia de variantes propias de estadios embrionarios del desarrollo en lugar de las isoformas adultas (Lin *et al.*, 2006). Estas alteraciones se han relacionado con varios de los fenotipos observados en pacientes. Así, el *splicing* alterado del receptor de la insulina *INSR*, del canal de cloro *CLCN1* y del integrador *BIN1* se han relacionado directamente con la resistencia a la insulina, la miotonía (Ranum y Cooper, 2006) y a la debilidad muscular (Fugier *et al.*, 2011) respectivamente. Otros transcritos alterados relacionados con defectos durante la relajación/contracción muscular son la ATPasa dependiente de calcio *SERCA* y el receptor de la rianodina *RyR* (Kumura *et al.*, 2005). Por último, alteraciones en los mensajeros de la *troponina T cardíaca* (*cTNT*) podrían ser la causa de los problemas cardíacos en los pacientes (Philips *et al.*, 1998).

Tejido	Transcrito	Exón implicado	Referencia
Músculo esquelético	<i>APL</i>	ex 5a, 5b	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>BIN1</i>	ex 11	(Fugier <i>et al.</i> , 2011)
	<i>CAPN3</i>	ex 16	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>CLCN1</i>	in 2, ex 7a, 8 ^a	(Mankodi <i>et al.</i> , 2002; Salvatori <i>et al.</i> , 2009)
	<i>FHOS</i>	ex 11 ^a	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>GFAT1</i>	ex 10	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>INSR</i>	ex 11	(Savkur <i>et al.</i> , 2001)
	<i>MBNL1</i>	ex 7	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>MBNL2</i>	ex 7	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>MTMR1</i>	ex 2.1,2.2	(Buj-Bello <i>et al.</i> , 2002)
	<i>NRAP</i>	ex 12	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>RYR1</i>	ex 70	(Kimura <i>et al.</i> , 2005)
	<i>SERCA</i>	ex 22	(Kimura <i>et al.</i> , 2005)
	<i>z-Titin</i>	ex Zr4,Zr5	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>m-Titin</i>	M-line ex5	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>TnnT3</i>	exón feta	(Salvatori <i>et al.</i> , 2009)
	<i>ZASP</i>	ex 11	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
Corazón	<i>cTNT</i>	ex 5	(Philips <i>et al.</i> , 1998)
	<i>ZASP</i>	ex 11	(Mankodi <i>et al.</i> , 2001)
	<i>ZASP</i>	ex 11	(Mankodi <i>et al.</i> , 2001)
	<i>m-Titin</i>	ex 11	(Mankodi <i>et al.</i> , 2001)
	<i>KCNAB1</i>	ex 2	(Mankodi <i>et al.</i> , 2001)
	<i>ALP</i>	ex 5	(Mankodi <i>et al.</i> , 2001)
	<i>ANK2</i>	ex 21	(Orengo <i>et al.</i> , 2008)
	<i>CAPZB</i>	ex 8	(Orengo <i>et al.</i> , 2008)
	<i>FXR1</i>	ex 15, 16	(Orengo <i>et al.</i> , 2008)
	<i>SCN5A</i>	ex 6 ^a	(Wahbi <i>et al.</i> , 2013)
Cerebro	<i>TAU</i>	ex 2, 10	(Sergeant <i>et al.</i> , 2001)
	<i>APP</i>	ex 7	(Jiang <i>et al.</i> , 2004)
	<i>NMDAR1</i>	ex 5	(Jiang <i>et al.</i> , 2004)

Tabla I2. Transcritos alterados en DM1

3.3.1 Implicación de Muscleblind y CELF1 en la espliceopatía

La desregulación del *splicing* de transcritos es uno de los principales sucesos patogénicos en DM1. Muchos de los pre-mensajeros alterados en DM1 son regulados por las proteínas CELF1 y MBNL1 actuando estas de forma antagonista. Dado que las proteínas MBNL1 y CELF1 reconocen regiones distintas en los mensajeros inmaduros, este antagonismo entre ambas no se debe a una competencia por el sitio de reconocimiento (Savkur *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2004). En condiciones no patológicas, una disminución de los niveles de CELF junto con una mayor expresión de MBNL1 posnatales permiten el cambio de patrón de *splicing* de numerosos genes, pasando de isoformas embrionarias a adultas. En individuos sanos, durante el desarrollo posnatal, la expresión de CELF1 en el corazón disminuye de manera dramática mientras que los

niveles de MBNL1 se cuadruplican. Así mismo, tras el nacimiento la localización de MBNL1 cambia de citoplasmática a nuclear (Kalsotra *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2006). No ocurre así en DM1, donde la regulación posnatal de ambas proteínas se altera provocando una reestructuración del transcriptoma.

El balance entre las proteínas MBNL1 y CELF1 regula la inclusión o exclusión de exones alternativos de determinados transcritos, por lo que el desequilibrio entre ambas proteínas provoca en los pacientes alteraciones en el procesado alternativo de numerosos transcritos (Philips *et al.*, 1998; Savkur *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2004). Un ejemplo de ello es el *splicing* del canal de cloro de tipo 1 (*CLCN1*). Durante el procesado de estos mensajeros en los pacientes se incorporan el intrón 2 o el exón 7a, ambos portadores de un codón de stop prematuro (Lueck *et al.*, 2007). Dicha inclusión da lugar a una proteína truncada y a una disminución de la cantidad de proteína *CLCN1* funcional (Charlet *et al.*, 2002; Mankodi *et al.*, 2002). El *splicing* de *CLCN1* está mediado tanto por MBNL1 como por CELF1 ya que la sobreexpresión de CELF 1 en células es suficiente para aumentar la inclusión del intrón 2 mientras que ratones *knockout* de *Mbnl1* muestran un *splicing* aberrante *Cln1* debido a la inclusión del exón 7 (Lueck, Mankodi *et al.*, 2007; Kanadia *et al.*, 2006). La falta de proteína funcional provoca una reducción de la conductancia al cloro, causando una despolarización en los potenciales de membrana en las fibras musculares y desencadenando la miofonía característica de la DM1. Por otro lado, el fenotipo de resistencia a la insulina en DM1 se atribuye al *splicing* aberrante del receptor de la insulina (*INSR*). Los pacientes de DM1 expresan en su musculatura la isoforma IR-B del receptor de la insulina, una isoforma que excluye el exón 11. Esta isoforma tiene una menor capacidad de señalización y una actividad tirosina quinasa menor que la isoforma larga denominada IR-A (Savkut *et al.*, 2001). Durante el desarrollo normal, CELF1 y MBNL1 actúan de forma antagonista sobre el *splicing* del exón 11 del *INSR* ya que mientras que MBNL1 promueve su inclusión, CELF1 induce su exclusión (Ho *et al.*, 2004) (Fig. 14). Finalmente, otro ejemplo del papel de CELF1 y MBNL1 en la regulación del *splicing* de pre-mensajeros está en el *splicing* de la troponina cardíaca *cTNT*. Aunque no se conoce exactamente el papel de las diferentes isoformas de la troponina *cTNT*, las miofibras que expresan la isoforma portadora del exón 5 son más sensibles al calcio que las isoformas cortas (McAuliffe *et al.*, 1990). Los individuos con DM1 muestran incremento en la inclusión del exón 5 que es regulado por CELF1 y MBNL1 de forma antagonista ya que mientras que CELF1 promueve su inclusión, MBNL1 la inhibe (Ho *et al.*, 2004).

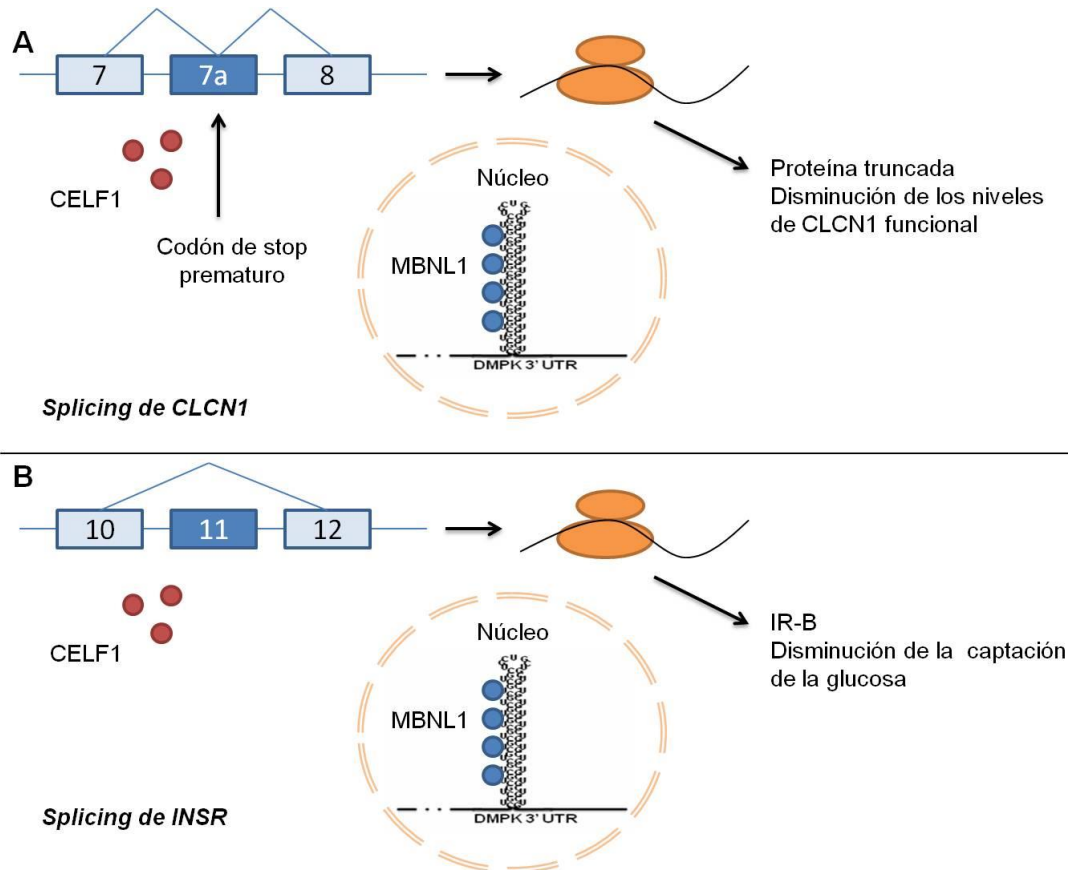


Figura 14. Ejemplos de alteraciones en el *splicing* en DM1 y sus consecuencias funcionales. (A) Las alteraciones en el *splicing* de *CLCN1* resultan en la degradación del transcrito debido a la presencia de un codón prematuro de stop contenido en el intrón 2 (no mostrado) y/o en el exón 7. (B) Las alteraciones en el *splicing* de *INSR* provocan la expresión de la isoforma IR-A, isoforma con una menor capacidad de señalización.

3.4 Alteración de factores de transcripción

Además de factores de *splicing*, entre las proteínas nucleares secuestradas por las repeticiones CUG también se encuentran varios factores de transcripción entre los que destacan las proteínas de especificidad 1 y 3 (SP1 y SP3), el receptor gamma del ácido retinoico (RARG) y las proteínas STAT1 y STAT3 implicadas en la traducción de las señales extracelulares y la activación de la transcripción (Ebralidze *et al.*, 2004). El secuestro de estos factores nucleares impide a dichas proteínas realizar sus funciones normales dentro de la célula impidiendo así la transcripción de sus genes diana. Uno de los genes alterados es el transportador de iones *canal de cloro tipo 1 (CLCN1)*, diana del factor de transcripción SP1. La alteración de SP1 parece contribuir, junto con las alteraciones en el *splicing* de *CLCN1* anteriormente descritas, a la miotonía observada en pacientes de DM1 y DM2.

Otros factores de transcripción alterados son NKX2-5, implicado en el desarrollo y la conducción cardíaca (Yadava *et al.*, 2008), la proteína MyoD, implicada en la miogénesis (Timchenko, Lakova *et al.*, 2001) y el factor de transcripción SHARP (SMART/HDAC1-associated repressor protein) que participa en la regulación de al menos 25 transcritos implicados en la función muscular (Dansithong *et al.*, 2011). También se ha observado la disminución del factor de transcripción Mef2 en el corazón de pacientes de DM1, lo que altera la expresión de un gran número de mRNAs y micro RNAs (miRNAs) cuyo efecto parece explicar la patología cardíaca observada en DM1 (Kalsotra *et al.*, 2014).

3.5 Desregulación de microRNAs

Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes que regulan la expresión génica mediante la disminución de los niveles de sus RNA mensajeros diana o mediante el bloqueo de su traducción (Ambros, 2001; Guo *et al.*, 2010). Tanto en DM1 como en DM2 se ha demostrado la desregulación de miRNAs en músculo esquelético y en corazón, pudiendo contribuir a su mecanismo de patogénesis (Gambardella *et al.*, 2010; Perbellini *et al.*, 2011; Rau *et al.*, 2011; Kalsotra *et al.*, 2014). Uno de los miRNAs alterado tanto en DM1 como en DM2 es miR-1, cuya alteración se asocia con la disfunción cardíaca observada en pacientes. La disminución de miR-1 en el tejido cardíaco lleva a la desregulación de dos importantes dianas de miR-1, la conexina GJA1, y el canal de calcio CACNA1C ambas implicadas en la regulación de la función cardíaca. Así mismo, se ha demostrado la implicación de las repeticiones CUG y el posterior secuestro de la proteína MBNL en la biogénesis de este miRNA (Rau *et al.*, 2011). Además de en estos tejidos, se han identificado miRNAs alterados en sangre de pacientes (Perfetti *et al.*, 2014) lo cual es de especial interés para un posible uso de los miRNAs como biomarcadores no invasivos que permitan monitorizar la progresión de la enfermedad así como la eficacia de los posibles tratamientos.

3.6 Silenciamiento de genes por generación de fragmentos de RNA interferente

Los RNAs de interferencia (siRNAs, del inglés small interfering RNAs) son pequeños fragmentos de RNA bicatenario altamente específicos para la secuencia de nucleótidos de su RNA mensajero diana, interfiriendo con ello en la expresión del gen respectivo (Rana, 2007). Los mensajeros *DMPK* portadores de repeticiones CUG forman estructuras de horquillas imperfectas a nivel de las repeticiones las cuales pueden ser diana de la maquinaria del RNA interferente generando pequeños siRNAs. En modelos celulares de DM1, estos siRNAs se unen a secuencias complementarias en transcritos diana silenciando su expresión, pudiendo contribuir a la patogénesis de la enfermedad

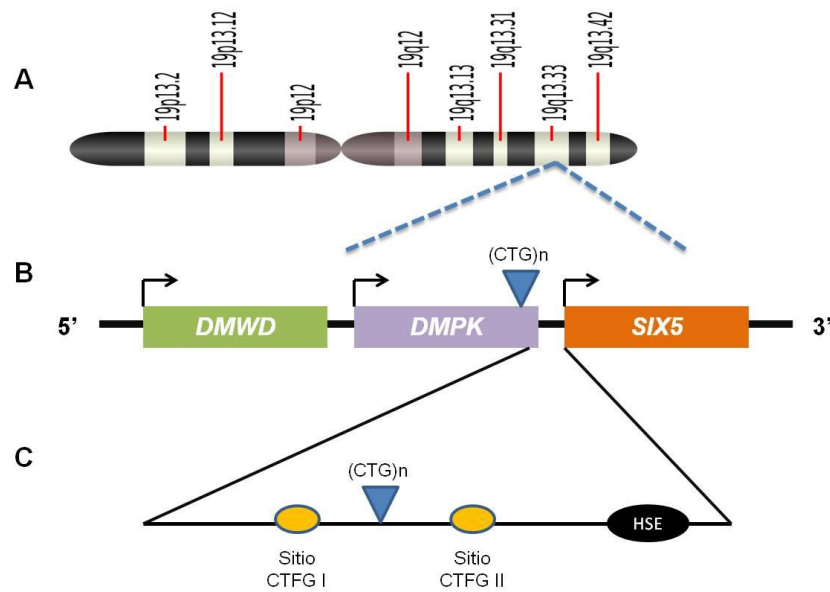
(Krol *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios realizados en ratones modelo de DM1 no reproducen los resultados observados en cultivo celular (Osborne *et al.*, 2009).

3.7 Traducción sin ATG asociada a repeticiones

La traducción sin ATG asociada a repeticiones se ha postulado como un mecanismo molecular que contribuye a la patogénesis de varias enfermedades incluida la DM1. Los transcritos de RNAs portadores de repeticiones CAG expandidas pueden ser traducidos en ausencia de un codón de inicio AUG. Esta traducción RAN (del inglés Repeat Associated Non-ATG translation) ocurre a lo largo de las repeticiones expandidas en todas las pautas de lectura produciendo péptidos homopolímeros de poliglutaminas, polialaninas, poliserinas y policisteinas (Zu *et al.* 2011; Pearson 2011). Los transcritos antisentido de *DMPK* generan mediante traducción RAN péptidos homopolímeros de poliglutamina en ratones modelo y en cardiomiocitos, leucocitos y mioblastos de pacientes. Este tipo de péptidos homopolímeros causan neurodegeneración en *Drosophila* (Mizielinska *et al.*, 2014) y podrían provocar proteotoxicidad similar a la descrita en las enfermedades de poliglutaminas como la enfermedad de Huntington o varias ataxias espinocerebelares (Zu *et al.* 2011).

3.8 Cambios epigenéticos

Diversos estudios sugieren que las repeticiones CTG expandidas provocan cambios significativos en la estructura local de la cromatina tales como el cambio en la localización de los nucleosomas (Wang *et al.*, 1994) y el aumento de la heterocromatina en la región (Brouwer *et al.*, 2013). Recientemente se ha descrito el aumento de los niveles de metilación en sitios CpGs en las regiones flanqueantes a las repeticiones expandidas, siendo esta metilación anormal no sólo única a las formas severas de Distrofia Miotónica congénita (López-Castel *et al.*, 2011; Brouwer *et al.*, 2013). Además, las repeticiones CTG inducen a la condensación del DNA en el locus DM1, lo que dificulta el acceso de los reguladores génicos pudiendo provocar una represión de la transcripción y cambios en la expresión de genes vecinos (Wang *et al.*, 1994). De hecho, el locus *DMPK* está flanqueado en 3' y 5' por los genes *SIX5* y *DMWD* (Klesert *et al.*, 1997), cuya expresión disminuye en presencia de las repeticiones expandidas (Fig. 15) (Alwazzan *et al.*, 1999; Thornton *et al.*, 1997).

**Figura**

I5.Organización del locus DMPK. (A) Región 19q13.3 donde se encuentra el gen DMPK. (B) Región genómica del cromosoma 19 comprendiendo el gen DMPK y sus dos genes adyacentes: *DMWD* y *SIX5*. La localización de las expansiones CTG se muestra mediante un triángulo azul. (C) Amplificación de la región comprendida entre el final del gen *DMPK* y el inicio de la transcripción de *SIX5*, mostrando los dos elementos aisladores CTCF y el sitio hipersensible a la DNasa I (HSE) que contiene el promotor de *SIX5*.

El gen *DMWD* es un gen de expresión ubicua. Su mayor presencia en testículos y cerebro ha postulado su implicación en la sintomatología observada en los pacientes de DM1 a nivel de cerebro. En éstos, la expresión de *DMWD* se reduce un 20-50% únicamente a nivel del citoplasma, siendo los niveles en el núcleo similares a los de individuos sanos (Frisch *et al.*, 2001). Por otra parte, el gen *SIX5* se expresa en la córnea, el epitelio de la lente y los fotorreceptores, encontrándose su expresión reducida en pacientes entre un 20-60%. Aunque se ha visto que ratones *knockout* de *Six5* desarrollan cataratas, estas son de una naturaleza diferente no relacionada con la DM1 (Sarkar *et al.*, 2000; Klesert *et al.*, 2000). La falta de función total de este gen en ratón provoca además de cataratas, atrofia gonadal y problemas en la conducción cardíaca por lo que *SIX5* podría estar implicado en la manifestación de estos síntomas observados en pacientes (Sarkar *et al.*, 2000).

Diferentes datos han mostrado que en el locus *DMPK* las repeticiones CTG expandidas forman junto con los dos sitios de unión la proteína CTCF un elemento aislador. Aunque se creía que la hipermetilación de la región CpG situada en 3' de *DMPK* inhibía la unión de CTCF perdiendo así el efecto aislador, estudios recientes en ratones modelo de DM1 han mostrado un aumento de la metilación CpG y de la heterocromatina local sin que los sitios de unión CTCF se vieran afectados (Breuwer *et al.*, 2013).

4. Tratamientos y terapias contra la DM1

A pesar de que la Distrofia Miotónica fue descrita por primera vez en 1909, a día de hoy, más de un siglo después, no existe un tratamiento eficaz para esta patología. En la actualidad, la única intervención terapéutica accesible para los pacientes reside en aproximaciones para paliar algunos síntomas aisladamente. Sin embargo, los recientes avances sobre el entendimiento de la enfermedad han llevado al desarrollo de nuevas estrategias tomando como diana a los diferentes MBNL agentes identificados en el mecanismo de patogénesis de la DM1 (Fig. 16).

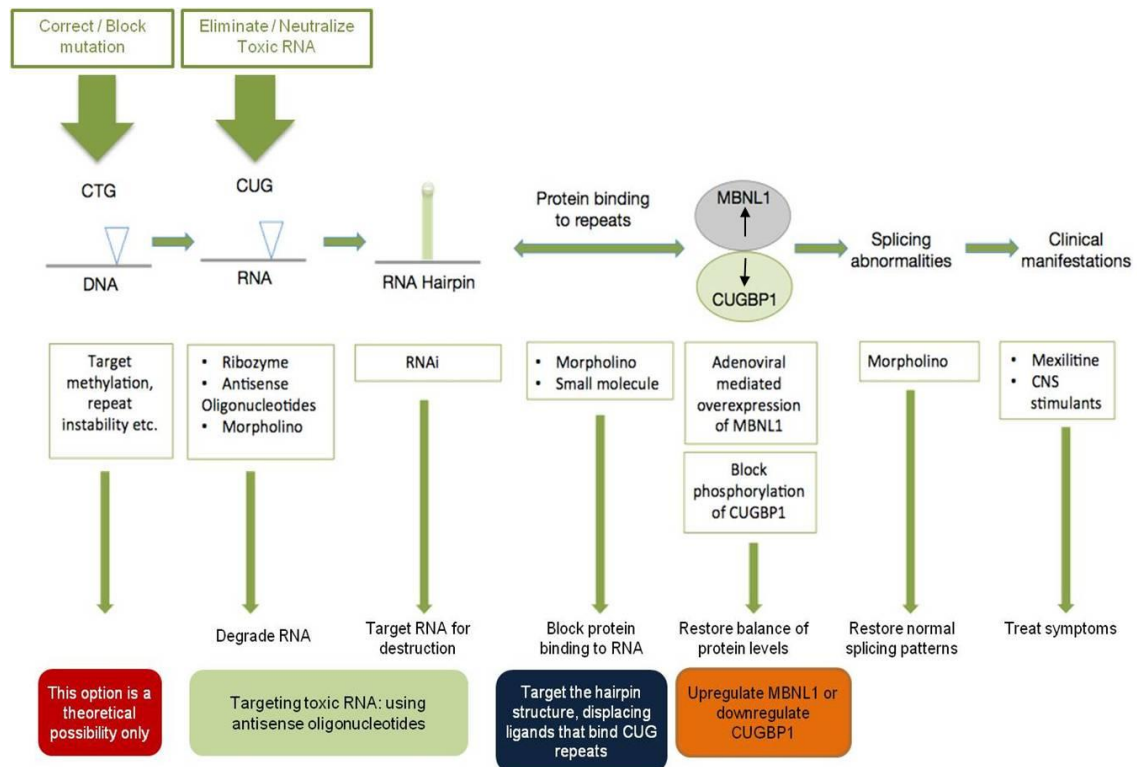


Figura 16 Mecanismo de patogénesis y posibles dianas terapéuticas en la DM1. Resumen de los diferentes parámetros dentro del mecanismo de patogénesis y las dianas terapéuticas asociadas. Para cada punto, se indica la estrategia terapéutica así como los posibles tratamientos asociados, algunos de ellos en actual desarrollo. Figura modificada de Foff y Mahadevan, 2011.

4.1 Corregir o bloquear la mutación a nivel del DNA

Esta opción es de momento una posibilidad teórica, ya que todavía no comprendemos bien el mecanismo por el cual las repeticiones se expanden tanto en células somáticas como en germinales. Sin embargo, en el futuro los mecanismos de reparación, las rutas de metilación y la maquinaria que regula la replicación del DNA durante el desarrollo pueden ser dianas clave para el control de la estabilidad de las repeticiones reduciendo su expansión así como la anticipación génica observada en pacientes (Foff y Mahadevan, 2011). En este sentido, se han identificado varias moléculas capaces de

reducir la tasa de expansión somática de las repeticiones CTG, resultando sin embargo extremadamente tóxicas (Gomes-Pereira y Monckton, 2004). Otra aproximación utilizando oligonucleótidos antisentido (ASOs) suprimió la inestabilidad somática de las repeticiones CTG en cultivos celulares y ratones modelo de DM1 (Nakamori *et al.*, 2011). Además de los ASOs, también pueden resultar prometedoras moléculas pequeñas capaces de interactuar directamente con las repeticiones CTG a nivel del DNA (Foff y Mahadevan, 2011). Moléculas como la pentamidina y su derivado heptamidina, además de unirse a las repeticiones CUG (Wart *et al.*, 2009), parecen unirse también a las repeticiones CTG a nivel del DNA (Coonrod *et al.*, 2013). Finalmente, estudios recientes han mostrado una mejora en el fenotipo DM1 en células iPS (célula madre pluripotente inducida) desarrolladas a partir de células madre de pacientes DM1, siguiendo una estrategia basada en eliminar las repeticiones CTG mediante la integración de señales poly A exógenas aguas arriba de la expansión en el gen *DMPK* (Xia *et al.*, 2015).

4.2 El RNA tóxico como diana

Teniendo en cuenta que la DM1 se debe a la ganancia de función del RNA, actuar directamente sobre el RNA portador de las repeticiones CUG parece ser una de las opciones más prometedoras hoy en día. Los trabajos realizados hasta la fecha se han centrado en actuar sobre este RNA tóxico mediante dos estrategias diferentes; degradar el RNA tóxico o bloquear la unión de proteínas de unión al RNA a las repeticiones.

4.2.1 La degradación del RNA tóxico

Un tipo de estrategia utilizada con este fin ha sido el uso de ribozimas. Las ribozimas son moléculas de RNA capaces de interactuar con otras moléculas de RNA, ya sea modificando la secuencia original del RNA diana mediante *splicing* o cortándola, provocando en última instancia la degradación del RNA (Phylactou *et al.*, 1998). Los primeros trabajos llevados a cabo con este tipo de moléculas mostraron que en fibroblastos humanos, las ribozimas son capaces de cortar una secuencia endógena del transcrito *DMPK* compuesta de 12 repeticiones CTG y sustituirla por otra de 5 repeticiones (Phylactou *et al.*, 1998; Phylactou, 2004). Sin embargo, estos ensayos se realizaron en fibroblastos con un número normal de repeticiones por lo que no mostraron cómo se puede trasladar esta técnica a un modelo con repeticiones expandidas ni si las ribozimas son capaces de distinguir entre el RNA normal y el mutante. En este sentido, Langlois y colaboradores, aprovechando el hecho de que únicamente los transcritos de *DMPK* mutante quedan retenidos en el núcleo, utilizaron ribozimas nucleares con la premisa de que estas sólo podrían tener acceso al RNA

mutante (Langlois *et al.*, 2003). Aunque los investigadores observaron una disminución de los *foci* y un restablecimiento parcial del *splicing* del receptor de la insulina, también vieron una reducción de los niveles tanto del RNA tóxico como del RNA normal. La disminución de los niveles del transcrito tóxico mediante su corte por ribozimas podría ser una terapia génica para la DM1 siempre que se consiga mejorar su especificidad y administración (Foff y Mahadevan, 2011).

Además de los ribozimas existen otras aproximaciones destinadas a degradar el RNA tóxico como es el uso de oligonucleótidos antisentido (ASO). Cabe remarcar que el término “oligonucleótidos antisentido” engloba hasta a cuatro tipos diferentes de moléculas. En general, los oligonucleótidos antisentido son secuencias cortas de cadena sencilla que se unen a un RNA diana. En DM1, el uso de ASOs que degradan el RNA tóxico mediante la activación de la RNasa H (también conocidos como *gapmers*) ha conseguido resultados positivos tanto en células como en ratón. Estos oligonucleótidos, además de disminuir de manera específica el RNA tóxico, reducen los *foci* nucleares tanto en células de pacientes como en ratones DM1 y han mostrado mejorar el *splicing* de los transcritos de *Cyber*, *Serca* y *Clcn1* tras su administración intramuscular en ratón (Lee *et al.*, 2012). A pesar de haberse descrito que los *gapmers* tienen una distribución pobre en los tejidos más afectados en DM1 (músculo esquelético, corazón y cerebro), Wheeler y colaboradores consiguieron disminuir los niveles de RNA tóxico en músculo esquelético tras la administración subcutánea de ASOs dirigidos contra la región 3'UTR del gen de la actina humana que porta las 250 repeticiones CTG en los ratones HSA^{LR}. Mediante esta aproximación los autores observaron una disminución de los *foci* nucleares, la liberación de MBNL1 y la mejora en la miotonía y en el *splicing* de diferentes transcritos. Además, la disminución de los niveles de RNA continuó estable un año después de la administración de los ASOs sin observarse efecto secundarios aparentes (Wheeler *et al.*, 2012). En la actualidad, existe una segunda generación de *gapmers* modificados químicamente que presentan una mayor actividad *in vivo* e *in vitro* contra DMPK de ratón, mono y humano, mostrando una inhibición de al menos el 70% del RNA tóxico en células musculares de las tres especies (Pandey *et al.*, 2015). Basándose en estos resultados, las compañías farmacéuticas Isis Pharmaceuticals (www.isispharm.com) y Biogen Idec (www.biogenidec.com) han desarrollado el *gapmer* ISIS-DMPKRx, cuya seguridad y eficacia se está testando en un ensayo clínico de fase II.

Finalmente, otra estrategia terapéutica en este sentido es el uso de RNAs interferentes (siRNAs) dirigidos al RNA mutante con el fin de que se active la vía Dicer de degradación del RNA. Las horquillas largas de doble cadena son dianas de Dicer, una ribonucleasa que reconoce los RNAs que serán posteriormente degradados. Krohl y colaboradores consiguieron activar este mecanismo en fibroblastos de pacientes mediante la introducción de un oligonucleótido antisentido (GUG)₇ provocando la

disminución selectiva de transcritos portadores de repeticiones largas (Krohl *et al.*, 2007).

4.2.2 La inhibición de la unión del RNA tóxico-proteínas

Dado que el secuestro y la pérdida de función de las proteínas Muscleblind tiene un papel clave en la patogénesis de la DM1, una aproximación terapéutica lógica es inhibir la interacción de dichas proteínas con el RNA tóxico formado por las repeticiones CUG. En los últimos años se han identificado tanto moléculas pequeñas como oligonucleótidos antisentido con este mecanismo de acción. Un primer trabajo destinado a encontrar moléculas capaces de inhibir la unión MBNL1-RNA fue el llevado a cabo por Gareiss *et al.* Mediante un modelo de ensayo competitivo, los autores rastrearon una librería de 11.325 compuestos identificando 4 compuestos activos (Gareiss *et al.*, 2008). Posteriormente, mediante un ensayo de retardo en gel se identificó la pentamidina, una pequeña molécula utilizada comúnmente como anti fúngico, y que mostró ser capaz de desplazar a MBNL1 en la unión a las repeticiones. En el estudio original, en células DM1 la pentamidina disminuyó el número de *foci*, mejoró los defectos de *splicing* de los transcritos *INSR* y *CTNT* y tras una administración intramuscular mejoró el *splicing* de *Cln-1* y *Serca* en ratones DM1. (Warf *et al.*, 2009). Sin embargo, esta molécula tiene unos niveles de toxicidad altos que hacen que la ventana terapéutica del compuesto sea pequeña. En los últimos años se han publicado un gran número de trabajos en los que se han diseñado distintos ligandos modulares capaces de unirse a repeticiones (C/CUG)_n desplazando a MBNL1 entre los que se encuentra el compuesto kanamicina A (Childs-Disney *et al.*, 2007). Además, el grupo del Dr. Zimmerman ha publicado diversos estudios en los que mediante un diseño racional identifican compuestos capaces de interferir en la unión MBNL1-RNA. Algunas de estas moléculas fueron capaces de revertir la toxicidad de las repeticiones CUG en modelos celulares y en *Drosophila* (Wong *et al.*, 2014). La modificación de estos compuestos para aumentar su eficacia *in vivo* es un reto a superar de cara a disponer de un fármaco eficaz contra la DM1.

Otra tipo de molécula incluida dentro de esta categoría es el péptido ABP1. Este péptido, identificado mediante ensayos *in vivo* en *Drosophila*, es capaz de unirse a la horquilla de doble cadena RNA tóxico provocando su desestructuración hacia una cadena de RNA sencillo. A nivel fenotípico, ABP1 reduce los *foci* ribonucleares y mejora la degeneración muscular en moscas modelo de DM1. Además, en ratones DM1 esta molécula es capaz de revertir defectos de *splicing* tras una administración intramuscular (García-López *et al.*, 2011).

Siguiendo una metodología basada en el rastreo de compuestos *in vivo* en un modelo de DM1 en *Drosophila*, en Valentia Biopharma identificamos la estefenantrina, una

molécula que se une de forma específica a la horquilla formada por las repeticiones. Esta molécula reduce los *foci* ribonucleares y mejora el *splicing* de diferentes transcritos en células de pacientes. Además, tras su administración intramuscular mejora un aspecto funcional de la enfermedad como es la miotonía en ratones DM1 de forma dependiente de dosis (manuscrito en preparación).

Los oligonucleótidos antisentido, también han mostrado ser eficaces en la inhibición de la unión de Muscleblind a las repeticiones. Wheeler y colaboradores desarrollaron un morfolino (GAG25) contra las repeticiones expandidas capaz de unirse al RNA tóxico *in vitro* inhibiendo la unión de otras proteínas al RNA. En ratones modelo, la inyección del morfolino mejoró diferentes aspectos de la enfermedad como son los *foci* ribonucleares, la distribución de MBNL1 y los niveles de miotonía. Así mismo esta molécula fue capaz de restaurar defectos de *splicing* de diversos transcritos hasta niveles comparables con los animales salvajes (Wheeler *et al.*, 2009). Mejoras posteriores sobre este morfolino llevaron a la generación del PPMO, un morfolino unido a un péptido de fácil penetrancia en la célula. La administración sistémica del PPMO provocó en el músculo esquelético mejoras equiparables a las asociadas al GAG25 (Leger *et al.*, 2013). PS58, otro tipo de ASO de bloqueo estérico (oligonucleótido antisentido del tipo 2'-O-metilfosfotioato) diseñado para unirse a las repeticiones CUG también produjo mejoras en el ratón modelo similares a las observadas con el GAG25. Sin embargo, los investigadores que trabajan con esta molécula observaron un efecto local y una disminución total de los niveles de DMPK (Mulders *et al.*, 2009). A pesar de que estos ASOs de bloqueo estérico no estaban diseñados inicialmente para degradar el RNA tóxico, si que se observó en ambos casos una disminución de este RNA (50% en el caso del morfolino y 80% para el PS58)(Wheeler *et al.*, 2009; Mulders *et al.*, 2009).

4.3 Restaurar los niveles de proteínas de unión al RNA

Dada la importancia de las proteínas MBNL1 y CELF1 en la patogénesis de la DM1, otro modo de atacar la enfermedad es restableciendo los niveles normales de ambas proteínas. De este modo, esperaríamos mejorar parte de los fenotipos observados en DM1. Atacar la ruta de patogénesis de la DM1 a este nivel puede resultar beneficioso, aunque debido a la complejidad de los procesos celulares provocados por la presencia de las repeticiones, el impacto terapéutico puede resultar menor en comparación a otras estrategias orientadas a atacar directamente a las repeticiones tóxicas.

Dos pruebas de concepto realizadas en ratones DM1 han validado la importancia de restaurar los niveles de dichas proteínas: el rescate mediante la expresión de MBNL1 de determinados fenotipos de la enfermedad, y la reducción de la patología cardíaca tras el tratamiento de ratones modelo con un inhibidor de PKC. Tal y como se describe

en el trabajo de Kanadia y colaboradores, la sobreexpresión de MBNL1 en los ratones modelo HSA^{LR} reduce los niveles de miotonía y restaura el *splicing* del canal de cloro (Kanadia *et al.*, 2006). Además, la sobreexpresión de MBNL1 en ratones sanos no provoca toxicidad asociada (Chamberlain y Ranum, 2012) abriendo la puerta a nueva estrategia terapéutica frente a la DM1. Sin embargo, la administración directa de MBNL1 pasaría por el uso de vectores adenovirales, que aunque tienen un futuro muy prometedor, todavía han de superar diferentes barreras técnicas para poder ser administrados en pacientes.

Por otro lado, dado que la activación de CELF1 parece ser debida, al menos en parte, a su fosforilación vía la ruta PKC, se ha trabajado sobre la hipótesis de que un inhibidor de PKC puede provocar la inhibición de CELF1. Basándose en esta idea Cooper y colaboradores administraron el inhibidor de PKC Ro-31-8220 en ratones que expresan las repeticiones CTG en el corazón de forma inducible (Wang *et al.*, 2009) observando una inhibición de los niveles de CELF1, una mejoría en la conductividad cardíaca y una disminución de la mortalidad. Dado que no se ha demostrado la eficacia de esta molécula en otros tejidos, y teniendo en cuenta el papel de PKC en la regulación de otras proteínas, es de esperar que la administración de esta molécula a nivel sistémico produzca un gran número de efectos no deseados. Utilizando este mismo razonamiento se han ensayado dos inhibidores de quinasas: C16 y C51 en células DM1, y aunque han mejorado diferentes aspectos de la enfermedad como los *foci* ribonucleares (Wojciechowska *et al.*, 2014), al igual que ocurre con los inhibidores de PKC, es posible que estas moléculas interactúen con otras quinasas no patogénicas.

4.4 Corregir el *splicing* de los transcritos alterados

Según el modelo actual de patogénesis de la DM1, se ha establecido una relación directa entre muchos de los síntomas observados en pacientes y defectos en el *splicing*. Aunque muchas de las aproximaciones terapéuticas anteriormente descritas pasan por mejorar defectos en el *splicing* de transcritos alterados, existen muy pocos estudios que tomen como diana terapéutica este punto del mecanismo de patogénesis. Una de las principales limitaciones de esta aproximación es que aquellas moléculas que actúen específicamente sobre el procesado alternativo de un transcrito pueden no ser activas frente a defectos de otros transcritos, mejorando únicamente uno de los síntomas de la enfermedad. Siguiendo esta premisa, Wheeler y colaboradores diseñaron ASOs específicos para los transcritos Clcn-1 (Wheeler, Lueck *et al.*, 2007) en ratones modelo DM1 observando una mejora de la miotonía. Sin embargo, debido al amplio número de mensajeros cuyo procesado se encuentra alterado en los pacientes, deberían combinarse ASOs con dianas diferentes para tratar los síntomas de una manera eficaz.

4.5 Métodos paliativos

Existen varias aproximaciones terapéuticas destinadas a paliar los diferentes síntomas de la enfermedad. El mexiletine, el cual modula los canales de sodio y disminuye la miotonía, así como estimuladores del sistema nervioso central que mejoran la fatiga son dos ejemplos de fármacos que se dan a los pacientes de forma rutinaria (Logigian *et al.*, 2010; Foff y Mahadevan, 2011). No todos los fármacos estudiados han llegado a administrarse a los pacientes, como es el caso de la hormona DHEA (sulfato de dehidroepandrosterona), que a pesar de haber obtenido resultados iniciales prometedores (Nakazora y Kirihara, 2005) no resultó eficaz en un ensayo clínico (Penisson-Besnier *et al.*, 2008). Otro ejemplo es el factor de crecimiento IGF-1 el cual mostró mejorar la fuerza muscular en adultos (Vlachopapadopoulou *et al.*, 1995), lo que llevó a desarrollar el IPLEX, la forma recombinante de este factor, que llegó a ser testada en un ensayo clínico de fase II obteniendo resultados negativos.

En conjunto, en las últimas décadas se han realizado grandes avances respecto a la búsqueda de nuevas terapias frente a la DM1. Sin embargo a la hora de obtener un tratamiento definitivo, todavía han de superarse diferentes escollos como son la mejora de la distribución de los ASOs y la obtención de datos *in vivo* que validen el efecto terapéutico de las pequeñas moléculas identificadas. Por ello, es necesario continuar y ampliar los esfuerzos por parte de la comunidad científica con el fin de encontrar fármacos eficaces contra esta enfermedad.

5. El rastreo de compuestos *in vivo* como herramienta para la búsqueda de fármacos

El descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso que puede durar más de una década y llegar a costar centenares de millones de euros. Este proceso se caracteriza por un alto grado de fracaso que puede llegar a ser del 90% hacia el final de los ensayos clínicos. El fracaso se debe, en muchas ocasiones, a la aparición de toxicidad o efectos secundarios inesperados o a que las propiedades ADME/Tox (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) del compuesto no son las adecuadas. Las propiedades ADME/Tox son una de las principales razones por las que un candidato falla en las últimas etapas del desarrollo, produciendo como consecuencia un gran impacto económico en la globalidad del proyecto. A fin de reducir el tiempo y los costes invertidos en I+D, en la actualidad se tiende a aplicar la estrategia *fail early, fail cheap* (fallo temprano, fallo barato) evaluando las propiedades ADME/Tox en las fases iniciales de la investigación (Paul *et al.*, 2010). En este sentido, los rastreos de compuestos *in vivo* constituyen una herramienta única para la búsqueda de fármacos puesto que permiten analizar la acción de una molécula en el

contexto de un organismo completo proporcionando, en un mismo ensayo, información sobre las propiedades ADME/Tox y la eficacia de un compuesto.

Actualmente los métodos de rastreos de compuestos de alto rendimiento o HTS (del inglés *high-throughput screening*) se basan en el uso de una única diana. Como consecuencia, muchos de los compuestos generados durante el rastreo resultan negativos al probarse en modelos animales (Giacomotto *et al.*, 2010). Para evitar estas limitaciones, se han buscado técnicas que permitan el análisis de librerías de compuestos en un organismo completo. Uno de los modelos animales más utilizado en biología es el ratón *Mus musculus*, sin embargo su alto coste limita su uso en rastreos de compuestos de alto rendimiento. Por el contrario, modelos más sencillos como el pez *Danio rerio*, el nematodo *Caenorhabditis elegans* o la mosca *Drosophila melanogaster* son una herramienta única para los rastreos HTS permitiendo el testeo de un compuesto sobre la totalidad de un organismo vivo.

5.1 *Drosophila* y los rastreos de compuestos *in vivo*

Desde hace más de un siglo, *Drosophila* se ha utilizado extensamente en prácticamente todas las áreas de la biología incluyendo campos como la genética, neurobiología, bioquímica o biología del desarrollo entre otros. En los últimos años, la gran cantidad de herramientas disponible para su estudio han hecho de la mosca un organismo idóneo para el estudio de las bases moleculares de múltiples enfermedades humanas. En comparación con otros animales modelo, cualquier estudio en *Drosophila* es más asequible que en vertebrados, ya que este organismo tiene una menor complejidad biológica, y cuenta con la ventaja de tener un corto intervalo generacional, lo que permite completar los experimentos con rapidez. Otra ventaja añadida es que el trabajo con *Drosophila* tiene un mantenimiento en el laboratorio sencillo y barato. La utilización de animales modelo invertebrados como la mosca, se ve además justificada por el alto grado de similitud genética con el genoma humano. Estudios de genómica comparativa estiman que hasta el 75% de los genes humanos implicados en enfermedades están conservados en *Drosophila* (Reiter *et al.*, 2001). La similitud entre los genomas humano y de *Drosophila* no se circunscribe sólo a los elementos genéticos, sino también a la relación entre ellos, ya que la conservación de las rutas de señalización ha sido ampliamente demostrada a través de numerosos ejemplos.

En la actualidad se han desarrollado en *Drosophila* diversos modelos de enfermedades humanas, siendo éstos especialmente relevantes para el estudio de disfunciones nerviosas y procesos neurodegenerativos (Bilen y Bonini, 2005). Esto se debe a que la mosca presenta un sistema nervioso altamente desarrollado que elabora comportamientos complejos y constituye un modelo especialmente atractivo para

estas patologías. Actualmente existen modelos en *Drosophila* para enfermedades como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, neuromusculares, infecciosas, inflamatorias, cardiovasculares, expansiones de microsatelites, desórdenes cognitivos, alteraciones del metabolismo y diabetes (Pandey y Nichols, 2011).

Debido a la larga historia de *Drosophila* como herramienta genética para el descubrimiento de genes implicados en determinados procesos biológicos, su aplicación más inmediata en el campo del desarrollo de nuevos tratamientos ha sido el descubrimiento de genes y la validación de los mismos como potenciales dianas terapéuticas (Jones *et al.*, 2009, Walker y Bernards, 2014). A pesar de su amplio uso en rastreos genéticos, el uso de *Drosophila* para el rastreo de fármacos es relativamente reciente. En 2005, Agrawal y colaboradores utilizaron un modelo de Enfermedad de Huntington en *Drosophila* con el fin de validar el uso de terapias combinatorias en esta patología (Agrawal *et al.*, 2005). El primer rastreo de compuestos como tal, se publicó en el 2006, cuando Jaklevic y colaboradores testaron una quimioteca formada por 1990 moléculas. En este rastreo, llevado a cabo en un modelo de cáncer en *Drosophila*, los autores identificaron 3 compuestos que potenciaron el efecto del tratamiento por radiación en moscas (Jaklevic *et al.*, 2006). Otros rastreos realizados en *Drosophila* han permitido identificar moléculas que interaccionan en la ruta de patogénesis del Síndrome de X frágil y la Distrofia Miotónica de tipo 1 (Chang *et al.*, 2008; García-López *et al.*, 2008). Además, cabe destacar que gracias a un rastreo de compuestos en *Drosophila* se identificaron los compuestos Ampyra y ZD6474, dos fármacos en ensayo clínico de fase III (www.clinicaltrials.gov) para el tratamiento de la Atrofia Muscular espinal y el cáncer de tiroides, respectivamente.

6. *Drosophila* y el rastreo de compuestos en DM1

6.1 Modelos de DM1 en *Drosophila*

Desde la generación en 2005 del primer modelo de DM1 en *Drosophila* este organismo se ha utilizado tanto para la elucidación de los mecanismos moleculares de esta enfermedad como para la búsqueda de fármacos. Housley y colaboradores fueron los primeros en generar un modelo de DM1 en *Drosophila* basado en la expresión inducible de 162 repeticiones CUG en la región 3'UTR de transcritos GFP (Housley *et al.*, 2005) utilizando el sistema de expresión ectópica de transgenes Gal4/UAS (Brand y Perrimon, 1993). Al igual que en pacientes, en estas moscas modelo Mbl se encuentra secuestrado en agregados nucleares. Gracias a la inducción de la toxicidad asociada a las repeticiones, los autores demostraron que los agregados nucleares son estructuras dinámicas que desaparecen tras el cese de la expresión del RNA tóxico. En este modelo, la expresión de las repeticiones no causó ningún efecto fenotípico observable,

demostrando por primera vez que la formación de agregados nucleares, incluyendo el secuestro de Mbl, no es tóxica *per se*. Posteriormente, se generaron otros modelos de DM1 en *Drosophila* basados en la expresión de 480 repeticiones CTG. Estos modelos reproducen síntomas de la enfermedad como la formación de *foci* nucleares, el secuestro de Mbl, alteraciones en el *splicing* de determinados transcritos, degeneración muscular progresiva, neurodegeneración y viabilidad reducida (Fig. 17) (de Haro et al., 2006; García- López et al., 2008). Estos modelos se han utilizado con éxito para la búsqueda de fármacos a pequeña escala en DM1 (García-López et al., 2008; García-López et al., 2011). Recientemente Picchio y colaboradores generaron un modelo inducible de DM1 en larvas de *Drosophila* (Picchio *et al.*, 2013) observando que, al igual que ocurre en adultos, la expresión de las repeticiones tóxicas en larva provoca síntomas a nivel muscular como una movilidad reducida y alteraciones morfológicas así como la alteración de numerosos genes cuya expresión varía respecto a los controles.

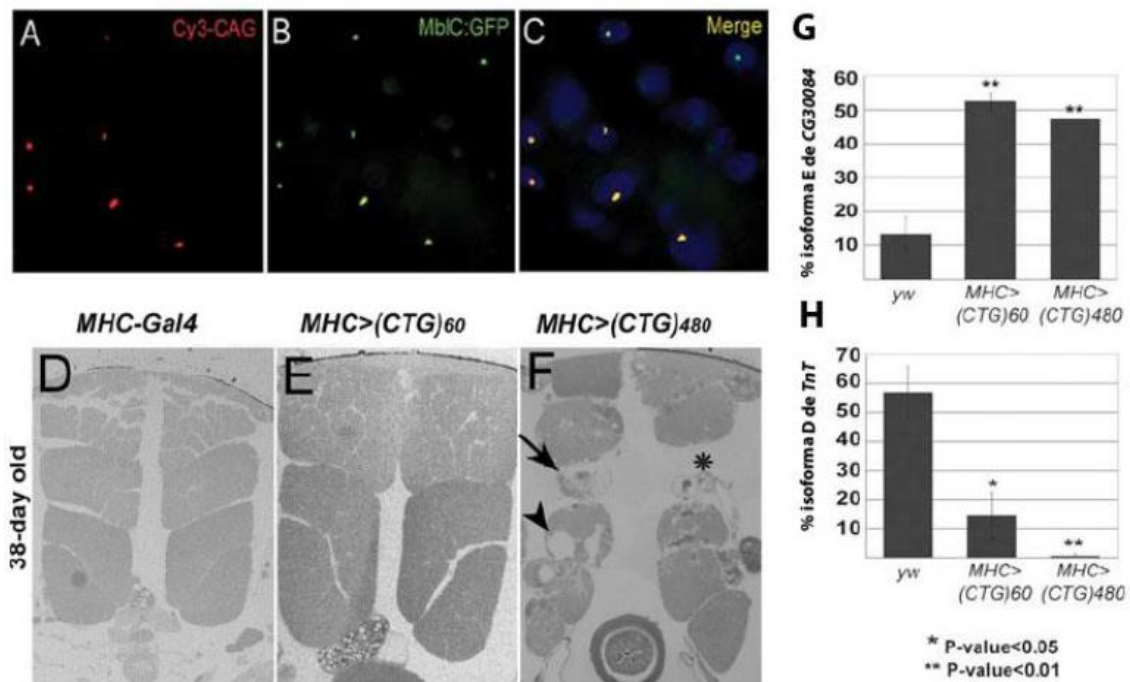


Figura 17. Fenotipos DM1 reproducidos en un modelo biomédico en *Drosophila*. La expresión de 480 repeticiones CTG en *Drosophila* produce la formación de agregados nucleares (A) que colocalizan con la proteína Muscleblind (B-C) además de degeneración (flecha) y desorganización en los paquetes musculares de los músculos indirectos del vuelo (asterisco) (F) en comparación con individuos control (D-E). Así mismo, estas moscas presentan alteraciones en el *splicing* alternativo de los transcritos CG30084 (G) y TnT (H). Figura modificada de García-López *et al.*, 2008

El mecanismo de patogénesis de la DM1 está fuertemente relacionado con las alteraciones en el *splicing* alternativo de genes. Tal y como se describe en apartados anteriores de este capítulo, se ha propuesto que la alteración del *splicing* de numerosos genes provoca la aparición de muchos de los síntomas de la DM1 (Lin *et al.*, 2006). Por ello, la identificación de moduladores químicos de procesos de *splicing*

puede llevar al desarrollo de nuevas terapias para los pacientes de DM1. Siguiendo esta propuesta, en Valentia Biopharma generamos y validamos un nuevo modelo de DM1 en *Drosophila* basado en moscas *spliceosensoras* para el rastreo de compuestos a gran escala. Este término, acuñado por nosotros (García-Alcover *et al.*, 2014), hace referencia a moscas que expresan un minigén que incluye un *splicing* alternativo crítico para la enfermedad fusionado a un gen reportero, de tal modo que cambios en el *splicing* del minigén provocan cambios en los niveles de expresión del gen reportero (Fig. I18). Para la generación de este modelo utilizamos el minigén humano del receptor de la insulina (*INSR*), cuyo procesado alternativo en el músculo de pacientes da lugar a la inclusión del exón 11. Las formas que incluyen el exón 11 dan como resultado una variante de la proteína atípica, poco señalizadora, que en la población sana deja de expresarse progresivamente en la etapa adulta. En los pacientes de DM1, la falta de señalización causada por la presencia de dicha proteína anómala, es la responsable de la resistencia a la insulina (Savkut *et al.*, 2001).

A fin de conseguir un método de lectura que permitiera el rastreo de compuestos en formato HTS, fusionamos la secuencia codificante de la proteína luciferasa al final del minigén (minigene:Luc) de forma que dicha luciferasa se expresa cuando no hay alteraciones en la pauta de lectura (estado no DM1) (Fig. I8A). Mediante el sistema de expresión de transgenes en *Drosophila* UAS/Gal4 (Brand y Perrimon, 1993), dirigimos la expresión de la construcción minigene:Luc a la musculatura somática de la mosca, un tejido relevante en la DM1. La expresión del transgén en presencia de las repeticiones CUG produjo una disminución de los niveles de luciferasa respecto a los niveles de expresión observados en ausencia del RNA tóxico (Fig. I8B).

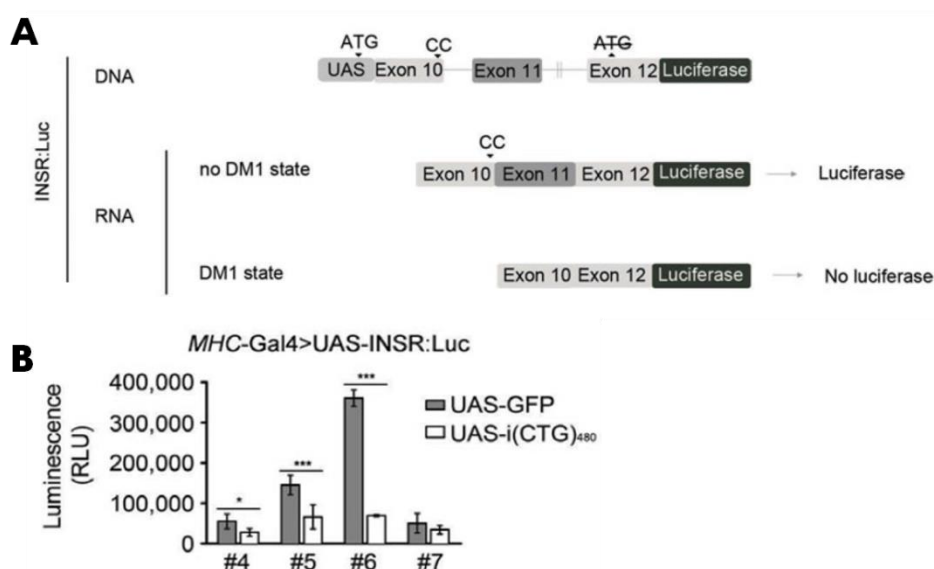


Figura I8. Generación de un modelo de DM1 basado en moscas *spliceosensoras*. (A) Representación esquemática del minigén del receptor de la insulina humano fusionado al reportero luciferasa (INSR:Luc) inyectado en embriones de *Drosophila* y^1w^{1118} . El procesado alternativo del minigén INSR en pacientes de DM1 da lugar a la inclusión del exón 11. La secuencia del minigén fue clonada en pauta de

lectura con el reportero luciferasa. Para ello, se eliminó el codón de inicio de la traducción de la luciferasa (ATG tachado) y se introdujo un ATG al inicio del minigén. Así mismo, con el fin de mantener la pauta de lectura, se añadieron dos nucleótidos CC en el exón 10. (B) En presencia de las repeticiones CTG, en diferentes stocks de moscas transformantes portadoras del transgén minigen:Luc (numerados con el símbolo#) expresado bajo el control del driver *Mhc-Gal4*, se produjo una reducción de los niveles de luciferasa debido pérdida de la pauta de lectura producida por la inclusión del exón 11 (UAS-i (CTG)₄₈₀). La columna UAS-GFP representa la luminiscencia obtenida al expresar el transgén en ausencia de las repeticiones tóxicas. Figura modificada de García-Alcover *et al.*, 2014

6.2 Rastreo de compuestos *in vivo* basado en un modelo *espliceosensor* en *Drosophila*

En Valentia Biopharma combinamos las ventajas de un rastreo de compuestos *in vivo* con nuestro modelo *espliceosensor*. La mayoría de los rastreos de compuestos descritos utilizando *D.melanogaster* han sido realizados a pequeña escala y de forma manual (Pandey y Nicols, 2011), por lo que mediante este trabajo fuimos los primeros en generar un rastreo de compuestos a gran escala analizando alrededor de 1.000 compuestos químicos diferentes a la semana. Tras la miniaturización y automatización de varios parámetros, establecimos un protocolo final para la búsqueda de compuestos que permite la lectura simultánea de una placa de 96 pocillos (Fig. 19) (García-Alcover *et al.*, 2014). El diseño experimental para el rastreo de compuestos *in vivo* consta de placas control así como de placas de ensayo. Las placas control, están formadas por moscas portadoras únicamente de la construcción minigen:Luc (moscas sanas) no tratadas (alimentadas sólo con DMSO). Estas moscas, además de como control positivo para la calibración de los niveles máximos de luminiscencia, se utilizaron para el cálculo del estadístico z-factor, parámetro que mide la calidad del ensayo (Zang *et al.*, 1999). Cada placa de ensayo está compuesta por 80 pocillos con moscas DM1 tratadas con los compuestos a testar, y 16 pocillos con moscas DM1 sin tratar, utilizadas como control negativo de la medida de los niveles de reportero en ausencia de compuesto. A fin de mantener una robustez estadística óptima, determinamos en 6 el número de réplicas necesarias para cada placa de ensayo.

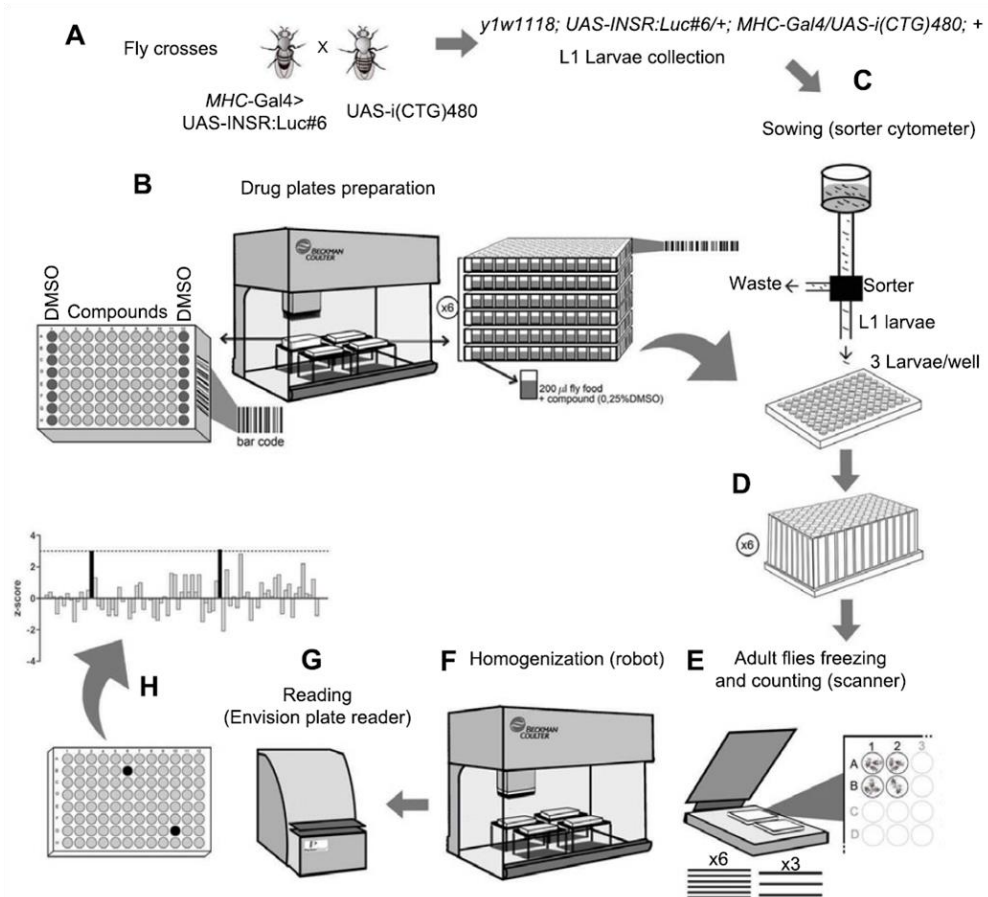


Figura 19. Metodología del rastreo de compuestos *in vivo* basado en las moscas *espirosensoras*. (A) Moscas portadoras de la construcción minigen:Luc expresado bajo el control del driver *Mhc-Gal4*, fueron cruzadas con moscas portadoras de las repeticiones tóxicas ($UAS-i(CTG)_{480}$) con el fin de obtener larvas L1 que expresen la construcción minigen:Luc en presencia de las repeticiones tóxicas CUG. (B) Los compuestos y el medio de cultivo de *Drosophila* se dispensaron en placas de 96 pocillos utilizando un robot dispensador de líquidos. (C) En cada pocillo, se dispensaron 3 larvas L1 utilizando un robot seleccionador de embriones. Cada placa de ensayo se cubrió con una placa de 96 pocillos de mayor profundidad (D). Las placas se incubaron 14 días a 25°C y posteriormente se congelaron. El número de adultos existente en cada pocillo se contabilizó con la ayuda de un escáner (E). Los adultos se homogeneizaron (F) y se midieron los niveles de luminiscencia de cada lisado con un lector de placas (G). Los resultados obtenidos se dividieron por el número de moscas del pocillo (H). Estos datos se utilizaron para calcular el *z-score* de cada compuesto de la placa. Figura tomada de Garcia-Alcover *et al.*, 2014

En una primera campaña de *screening* analizamos la actividad de 16.063 moléculas químicas diferentes evaluando su capacidad para rescatar defectos en el *splicing* del receptor de la insulina provocados por las repeticiones CTG. La actividad de cada compuesto fue interpretada en función del aumento de los niveles de luminiscencia en nuestras moscas DM1 *espirosensoras* y los resultados fueron analizados como valores de *z-score* (Kreyszig, 1979). A la hora de analizar los resultados, inicialmente medimos la calidad de cada una de las placas de ensayo mediante la determinación del *z-factor*. Posteriormente medimos el *Z-score* de cada uno de los compuestos

incluidos en aquellas placas con z-factor positivo, tomando como positivos aquellos compuestos que estuvieran cerca de triplicar los niveles basales de luminiscencia. Finalizado el análisis de los 16.063 compuestos, identificamos 126 compuestos como positivos en el rastreo primario, lo que resultó en un ratio de compuestos positivos del 0,78% (Garcia-Alcover et al., 2014). Dentro de estos compuestos determinados como positivos se encontró la boldina, un compuesto natural de estructura conocida y ampliamente estudiado, que fue seleccionado para su posterior validación además de por su actividad en el rastreo primario, por su estructura común a la de otro compuesto activo identificado en dicho rastreo.

Objetivos

Objetivos

La Distrofia Miotónica de tipo 1 (DM1), es una enfermedad rara sin un tratamiento efectivo. Los tratamientos disponibles en la actualidad se limitan a fármacos paliativos que alivian parcialmente los diferentes síntomas, sin parar o frenar la progresión de la enfermedad.

Durante la última década, los avances en la comprensión de las alteraciones que suceden a nivel celular al inicio de la enfermedad han permitido abordar nuevas estrategias en la búsqueda de fármacos, tomándose como diana a los diferentes factores identificados e implicados en el mecanismo de patogénesis de la DM1.

En este sentido, en Valentia Biopharma llevamos a cabo un rastreo *in vivo* de más de 15.000 moléculas químicas diferentes mediante el uso de un modelo de DM1 establecido en *Drosophila* (moscas *espliceosensoras*). Este modelo animal reproduce las mismas alteraciones del procesado alternativo de transcritos diana de Muscleblind previamente observadas y caracterizadas en pacientes con esta enfermedad (García-Alcover *et al.*, 2014). A su finalización, nuestra novedosa aproximación nos permitió identificar como compuesto candidato a ser desarrollado como un fármaco para DM1 a la boldina, un alcaloide de origen natural, de estructura conocida y con diferentes propiedades terapéuticas descritas.

Dado el contexto en el que se engloba este trabajo, nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Validar la eficacia del alcaloide boldina en modelos en *Drosophila*, celulares y murinos de DM1.

Objetivo 2. Determinar el mecanismo por el cual la boldina reduce la toxicidad asociada a las repeticiones CTG.

Objetivo 3. Caracterizar las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas de la boldina con el fin de establecer su posible uso como terapia frente a la DM1 en humanos.

Resultados

Resultados

1. La boldina, identificada en un rastreo químico *in vivo*, mejora un fenotipo DM1 en moscas *esplíceosensoras*

Con el fin de identificar nuevas terapias frente a la DM1, diseñamos un novedoso método de rastreo para la búsqueda de compuestos *in vivo* mediante el uso de nuestras moscas DM1 *esplíceosensoras* (García-Alcover *et al.*, 2014). Para ello, diseñamos una plataforma totalmente automatizada que permite rastreos químicos a gran escala (HTS, por sus siglas en inglés High Throughput Screening) *in vivo* en placas de 96 pocillos. Tras su utilización por primera vez para la validación de 16.063 pequeñas moléculas procedentes de librerías de compuestos con diferente naturaleza química, se seleccionaron como positivos primarios a aquellas moléculas capaces de producir un aumento en los niveles de luciferasa por encima de tres desviaciones típicas, lo que se traduce en un valor de Z-score de 3 o superior. En un primer ensayo, de los 16.063 compuestos testados se identificaron 126 como positivos (García-Alcover *et al.*, 2014).

El cabeza de serie de los compuestos identificados en el rastreo primario fue la estefenantrina (García-Alcover, 2015). Con el fin de identificar la región estructural de la estefenantrina responsable de su actividad biológica, en una primera aproximación, buscamos aquellas moléculas con una estructura química similar dentro de las diferentes colecciones de compuestos analizadas en el rastreo primario. Esto permitió la identificación de un segundo compuesto, la boldina, (Fig. R1) cuyo valor de Z-score en el rastreo primario fue de 2.5, lo que la posicionó inicialmente fuera del grupo de compuestos seleccionados como positivos primarios. Dado que el Z-score de la boldina fue cercano al umbral marcado para la determinación de compuestos positivos, y sobre todo, dada su similitud estructural con otro compuesto activo, la boldina fue seleccionada como un compuesto prometedor para su posterior para su posterior validación.

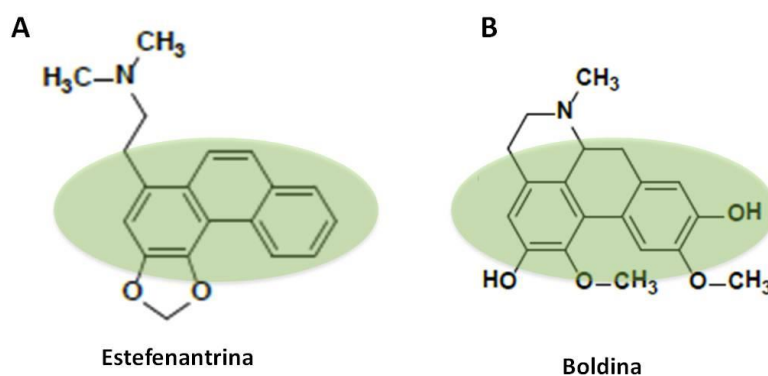


Figura R1. La boldina es un compuesto estructuralmente similar a la estefenantrina. (A) Estructura química del compuesto estefenantrina identificado como cabeza de serie en el rastreo primario. (B) Estructura química de la boldina. Las regiones similares de ambas moléculas se muestran con un círculo verde.

Una primera validación de la actividad de la boldina fue comprobar la respuesta de moscas *esplíceosensoras* al tratamiento con boldina de manera individual.

En el rastreo primario, los niveles de luciferasa se normalizaron mediante la división de los valores totales de luciferasa por el número de moscas del pocillo. Teniendo en cuenta que tanto en la musculatura indirecta como en todo el cuerpo de la mosca los niveles de luciferasa podrían aumentar de forma inespecífica y no relativa a la actividad del compuesto, esta metodología podría llevar a la identificación de falsos positivos. Por ello, diseñamos un experimento que nos permitió validar la actividad de la boldina analizando el incremento de los niveles de luciferasa individuales de al menos 8 moscas *esplíceosensoras* portadoras de las repeticiones CTG (*MHC-Gal4>UAS-INSR:Luc#6;UAS-i(CTG)₄₈₀*) tratadas con boldina a la concentración utilizada en el rastreo primario (Fig. R2). Como control, utilizamos moscas del mismo genotipo alimentadas con dimetilsulfóxido (DMSO), solvente en el que se disolvieron los compuestos en el rastreo primario.

Los niveles de luminiscencia obtenidos tras el análisis de moscas individuales tratadas con boldina fueron significativamente mayores a los relativos a moscas alimentadas con DMSO, lo que confirma la actividad de la boldina como tal, eliminando la posibilidad de que fuera un falso positivo.

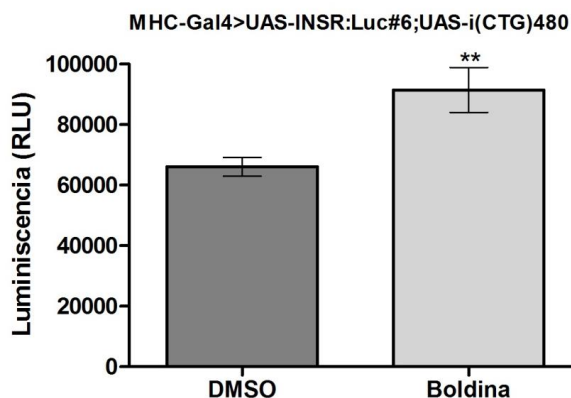


Figura R2. Resultados obtenidos para la boldina en el ensayo de 8 puntos. El tratamiento con boldina a 12.5 μ M en moscas *esplíceosensoras* que expresan las repeticiones CTG mostró un aumento significativo (p -valor < 0.005) de los niveles de luciferasa respecto al control (moscas tratadas con 0.25% DMSO). Calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa GrapPhad.

2. Validación de la actividad anti-CUG de la boldina en *Drosophila*

2.1 El aumento de los valores de luciferasa producido por la boldina no es debido a un efecto directo sobre la luciferasa, el sistema UAS/Gal4 ni sobre las repeticiones CTG

Debido al diseño experimental del rastreo primario, podría suceder que la boldina afectara directamente a la luciferasa provocando un aumento de actividad de forma inespecífica. A fin de descartar un efecto de la boldina sobre la transcripción, traducción, procesamiento o estabilidad de la luciferasa, analizamos la expresión de esta proteína en la musculatura de moscas tratadas con boldina y con DMSO. El tratamiento con boldina en moscas sanas capaces de expresar luciferasa (*Mhc-Gal4;UAS-Luc*) provocó niveles de luminiscencia equiparables a los observados en moscas del mismo genotipo alimentadas con DMSO (Fig. R3A), lo que indica que el efecto de la boldina sobre el *esplíceosensor* no se debe a una interacción inespecífica con la expresión de la luciferasa.

A su vez, analizamos la posibilidad de un efecto específico de la boldina sobre el sistema de expresión UAS/Gal4 (sistema utilizado para dirigir la expresión de las repeticiones y el *esplíceosensor* a la musculatura somática de la mosca durante el rastreo primario). Si la boldina interfiriera con el sistema de expresión ectópica UAS/Gal4, podría disminuir la transcripción de las repeticiones CTG, aumentando así los niveles de luminiscencia de forma inespecífica. Frente a esta posibilidad, medimos la actividad luciferasa de moscas *esplíceosensoras* sin la presencia de las repeticiones CTG (*Mhc-Gal4>UAS-INSR:Luc#6*) tratadas con boldina y DMSO. El hecho de obtener niveles de luminiscencia similares en ambos casos, confirmó que el aumento de la luciferasa provocado por la boldina, no es debido a una menor expresión del transgén CTG (Fig.R3B)

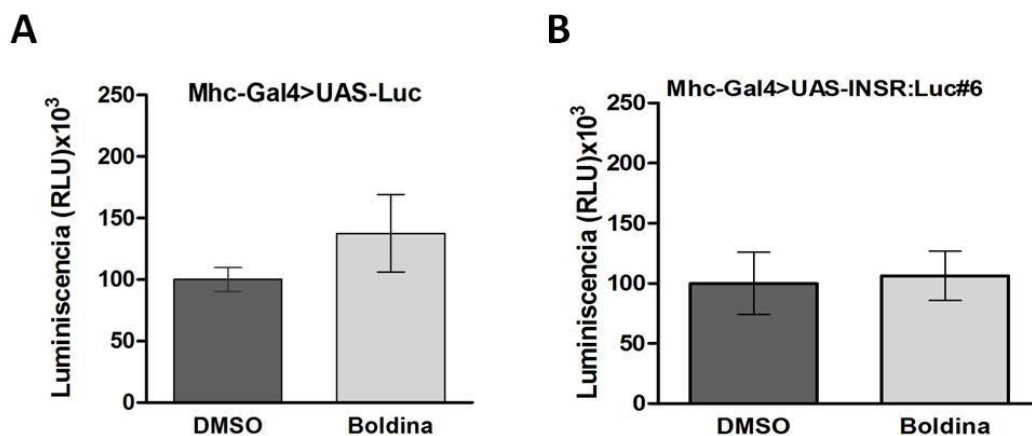


Figura R3. La boldina no afecta a la luciferasa ni a los niveles de expresión de las repeticiones CUG. (A) Niveles de luminiscencia en moscas *Mhc-Gal4>UAS-Luc* tratadas con boldina y DMSO. El valor de significancia estadística obtenido (p -valor <0.01) no llega a los niveles establecidos como diferentes, lo que confirma que la boldina no interacciona de forma inespecífica con la luciferasa. (B) Actividad luciferasa en moscas *Mhc-Gal4>UAS-INSR:Luc#6* tratadas con boldina o DMSO. No se observó una interferencia de la boldina con el sistema de expresión UAS/Gal4. En todos los casos la dosis de boldina administrada fue la aplicada en el rastreo primario (12.5 μ M). Como control se utilizó 0.25% de DMSO. Medidas calculadas con el test t de student no pareado utilizando el programa GraphPad.

2.2 La boldina reduce la formación de *foci* ribonucleares en *Drosophila*

Uno de los principales signos histopatológicos de la DM1 es la formación de *foci* ribonucleares que son agregados que se acumulan en el núcleo, formados por la horquilla de RNA tóxico de doble cadena y diferentes proteínas nucleares (Michalowski *et al.*, 1999; Mooers *et al.*, 2005).

Dado que la boldina resultó eficaz en un ensayo basado en la recuperación de un suceso de *splicing* dependiente de Muscleblind, decidimos evaluar la eficacia de este compuesto sobre la formación de *foci*, uno de los principales signos moleculares de la DM1. Para ello, se analizó la distribución del RNA formado por las repeticiones CUG en los músculos indirectos del vuelo (IFMs, del inglés *indirect flight muscles*) tomando secciones longitudinales del tórax de la mosca. Durante el experimento, se analizaron moscas modelo de DM1 (*MHC-Gal4>UAS-INSR:Luc#6;UAS-i(CTG)₄₈₀*) tratadas con boldina o con DMSO. La administración oral de la boldina redujo de forma significativa la formación de *foci* ribonucleares en los músculos indirectos del vuelo de *Drosophila* siendo esta reducción del 49.4% respecto a las moscas control (Fig. R4). Así mismo, el número de células con *foci* disminuyó al 30.2% en individuos alimentados con boldina frente al 60.1% observado en individuos tratados con DMSO (Fig. R4C).

Estos resultados confirman que la boldina reduce la formación de *foci* ribonucleares en *Drosophila*.

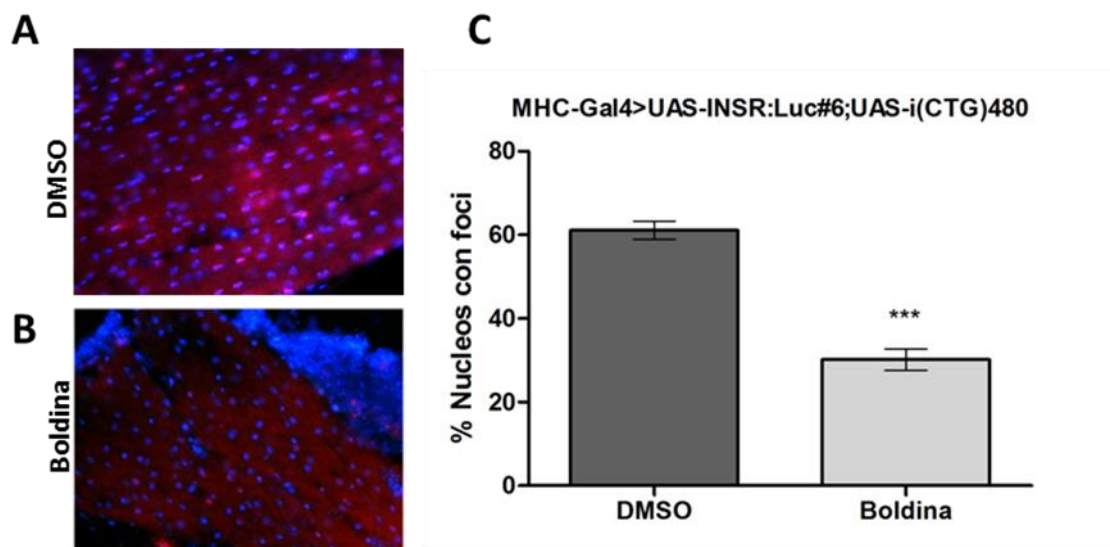


Figura R4. La boldina reduce la formación de *foci* en los músculos indirectos del vuelo de *Drosophila*. Hibridación *in situ* de cortes transversales de musculatura de moscas tratadas con DMSO (0.25%) (A) o boldina (12.5 μ M) (B). Los núcleos celulares fueron marcados en azul mientras que la sonda CAG marca los *foci* en rojo. La boldina disminuye el número de núcleos con *foci* de manera estadísticamente significativa (C). *** p-valor <0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa GraphPad. Las barras de error corresponden al error estándar.

2.3 La boldina mejora un fenotipo funcional de longevidad en moscas modelo de DM1

Siguiendo con la validación de la eficacia de la boldina *Drosophila*, decidimos analizar la actividad de esta molécula sobre un ensayo funcional, utilizando el fenotipo de longevidad disminuida descrito en moscas modelo de DM1 (García-López *et al.*, 2008). En dichas moscas DM1, la expresión de 480 repeticiones CTG bajo el control del promotor de la cadena pesada de la Miosina (línea *MHC-Gal4*) provoca defectos a nivel histológico en los músculos indirectos del vuelo tales como la pérdida de fibras musculares y la degeneración progresiva, además de provocar una disminución de la longevidad respecto a moscas control sanas (*yw*) (García-López *et al.*, 2008). A fin de evaluar la eficacia de la boldina sobre este fenotipo, medimos durante 50 días la supervivencia de moscas *MHC-Gal4>UAS-(CTG)₄₈₀* alimentadas con boldina o con DMSO. La longevidad de las moscas DM1 tratadas con boldina aumentó, observándose diferencias estadísticamente significativas entre la curva de supervivencia de las moscas modelo tratadas con boldina y la curva de las moscas modelo alimentadas con DMSO (Fig.R5). Como control positivo de la supervivencia se utilizaron moscas *yw* tratadas con DMSO, cuya supervivencia fue notablemente mayor que la de las moscas DM1 alimentadas con DMSO.

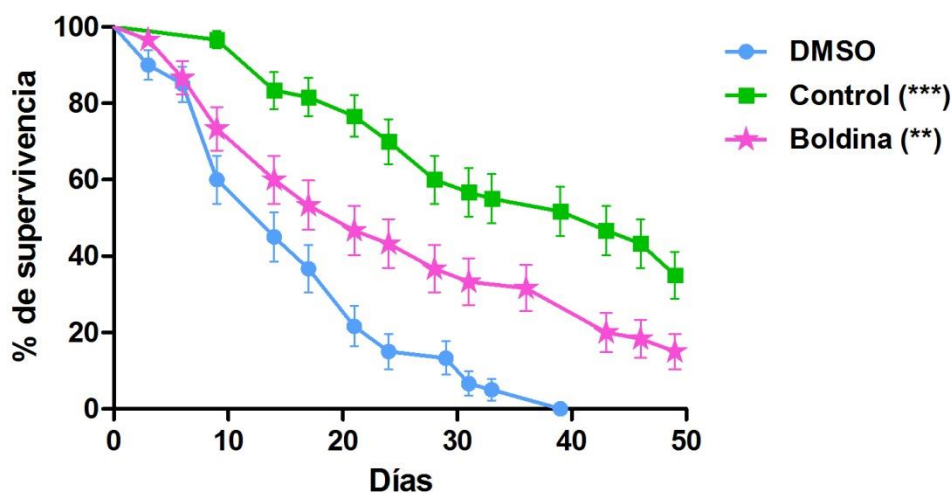


Figura R5. La boldina aumenta la supervivencia de moscas modelo de DM1. Curvas de supervivencia representando el porcentaje de moscas supervivientes en función del tiempo en días. Representación de las curvas de supervivencia de moscas *MHC-Gal4>UAS-(CTG)₄₈₀* tratadas con boldina (50 μ M)(Boldina) o con DMSO (0.25%)(DMSO) y de moscas *yw* tratadas con DMSO (Control). ***p-valor<0.0001 calculado con el test de Kaplan-Meier utilizando el programa Graphpad.

Los experimentos llevados a cabo en diferentes modelos de DM1 en *Drosophila* han confirmado que, en este organismo, la boldina mejora fenotipos relacionados con la enfermedad humana tanto a nivel molecular como fenotípico.

3. Actividad de la boldina frente a alteraciones DM1 en líneas celulares derivadas de pacientes

Siguiendo con el primer objetivo de este trabajo, y una vez determinada la actividad de la boldina en un modelo de DM1 en *Drosophila*, decidimos evaluar la eficacia de dicho compuesto en un contexto humano. Para ello, diseñamos diferentes ensayos en fibroblastos derivados de pacientes o de individuos sanos (líneas celulares cedidas por el Dr. Adolfo L. de Munain Hospital de Dosnosti). Estos fibroblastos fueron previamente transducidos de forma estable con MyoD por el grupo del Dr. Munain (método descrito en Larsen *et al.*, 2011), haciendo así posible su transdiferenciación inducible a mioblastos.

3.1 La boldina reduce la formación de foci ribonucleares en fibroblastos DM1 humanos

Dado que la boldina inhibió la formación de *foci* ribonucleares en *Drosophila*, si este compuesto actuara de forma similar en un contexto humano, cabría esperar que también redujera la formación de *foci* ribonucleares en células humanas.

Testamos la actividad de la boldina sobre los *foci* de RNA tóxico en fibroblastos de pacientes portadores de 333 repeticiones CTG (línea celular 9.73). Los fibroblastos 9.73, se incubaron durante 24 h con boldina a 100 μ M (concentración inferior a la Dosis Letal 10 calculada para este compuesto $DL_{10} = 441 \mu$ M, ver apartado 6.3.1). Como control, se utilizaron células 9.73 incubadas con DMSO (1%). La presencia de los *foci* ribonucleares se determinó mediante hibridación *in situ* fluorescente con sonda CAG marcada (Fig. R6) y fue posteriormente cuantificada.

Mientras que en fibroblastos derivados de individuos sanos no se detectó ningún *foci*, sí que se encontraron *foci* en fibroblastos derivados de pacientes (Fig. R6). Las células 9.73 tratadas con boldina durante 24 h mostraron una reducción en el número de *foci* presentes en el núcleo celular respecto al tratamiento con DMSO, pasando de una media de 2.7 *foci* por célula control (DMSO), a una media de 1.3 *foci* en las células tratadas con boldina. Además, el tratamiento con boldina aumentó el número de fibroblastos sin *foci* respecto al tratamiento con DMSO.

Tras observar la reducción estadísticamente significativa del número de *foci* ribonucleares en células DM1 asociada al tratamiento con boldina, concluimos que, tal y como sucede en *Drosophila*, la boldina es capaz de mejorar una alteración histopatológica típica de la enfermedad en un contexto humano.

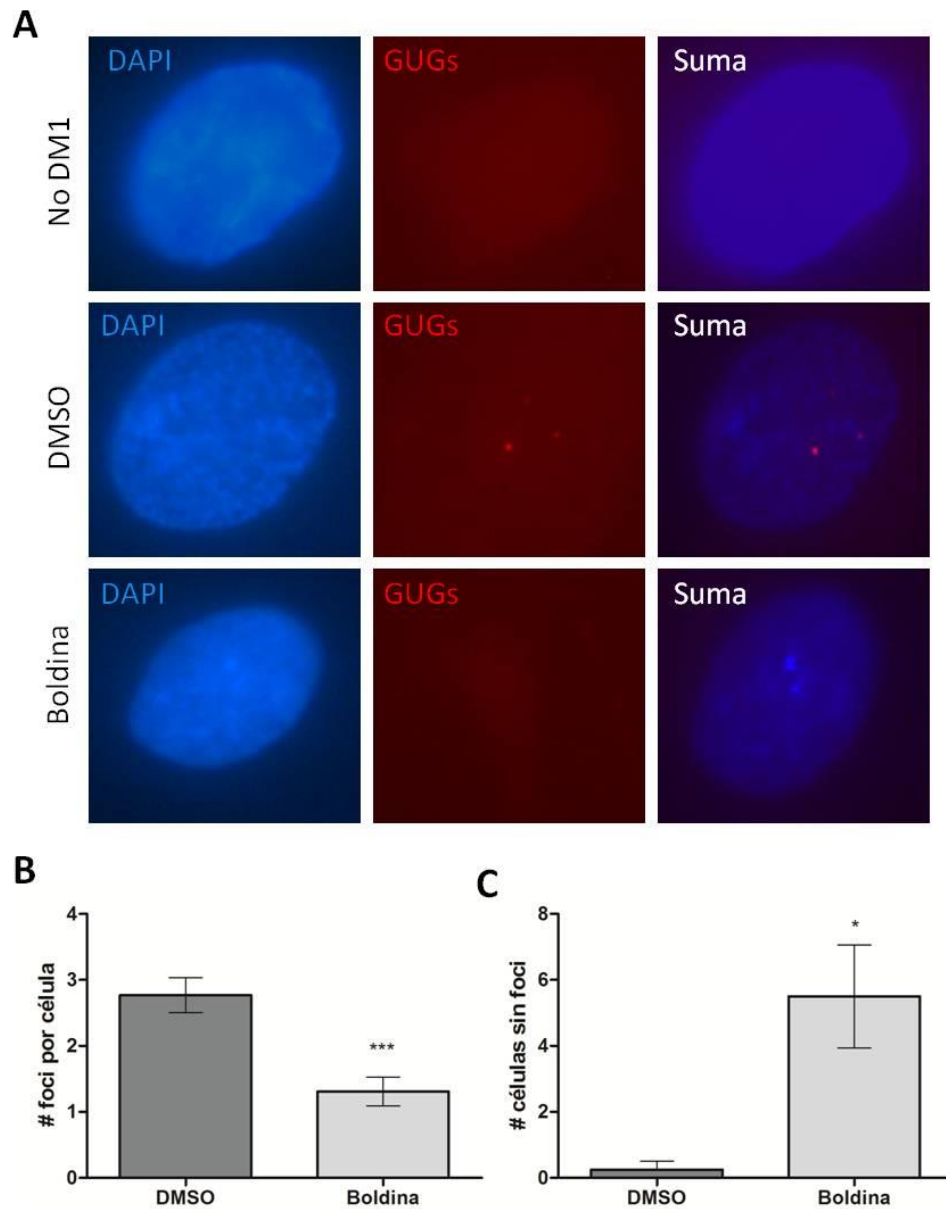


Figura R6. La boldina reduce la formación de *foci* ribonucleares en fibroblastos derivados de pacientes. (A) Hibridación *in situ* fluorescente mostrando los *foci* ribonucleares en fibroblastos derivados de pacientes tratados durante 24 h con boldina a 100 μ M (Boldina) o con DMSO (1%) (DMSO). Los núcleos se muestran marcados con DAPI en azul mientras que los *foci* se muestran marcados por la sonda CAG en rojo. No se encontraron *foci* en fibroblastos derivados de individuos sanos (No DM1). (B) Cuantificación del número de *foci* contenidos en el núcleo de fibroblastos derivados de pacientes tratados con DMSO o Boldina ***p-valor<0.001. (C) Cuantificación del número de células sin *foci* tras el tratamiento de fibroblastos derivados de pacientes con DMSO o Boldina *p-valor<0.01. Las cuantificaciones en (B) y (C) se llevaron a cabo contando al menos 100 núcleos (25 núcleos en 2 campos independientes y 4 réplicas biológicas). P-valor calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa GrapPhad. Las barras de error corresponden al error estándar.

3.2 El tratamiento con boldina no cambia la distribución de MBNL1 en el núcleo celular de mioblastos DM1

En estadios tempranos del desarrollo, la proteína MBNL1 se localiza principalmente en el citoplasma, sin embargo, tras el nacimiento la localización subcelular de MBNL1 cambia de citoplásmica a nuclear (Lin et al., 2006). En condiciones normales, la distribución de MBNL1 en la célula es homogénea a lo largo del núcleo, no ocurre así en células DM1, donde la mayor parte de dicha proteína queda secuestrada por las repeticiones CUG formando los ya descritos *foci* ribonucleares.

A fin de estudiar si la boldina es capaz de mejorar la distribución de MBNL1 y de aumentar la cantidad de proteína libre, se cuantificó el área nuclear en la que está presente MBNL1 en mioblastos derivados de pacientes portadores de 1.333 repeticiones CTG (línea 9.56) tratados con boldina a 100 μ M o con DMSO (1%). Como control, se utilizaron mioblastos derivados de individuos sanos (Fig. R7). La distribución de MBNL1 en mioblastos DM1 no se modificó tras el tratamiento con boldina encontrándose la mayor parte de la proteína en una reducida área del núcleo que podría corresponder a los *foci* ribonucleares. Así mismo, tampoco se observaron diferencias respecto a los niveles de MBNL1 libre en el núcleo en mioblastos tratados con boldina o con DMSO.

Estos datos indican que aunque la boldina reduce la formación de *foci* en fibroblastos DM1, este compuesto no aumenta la cantidad de MBNL1 libre en el núcleo de otro tipo celular, como los mioblastos modelo de la enfermedad.

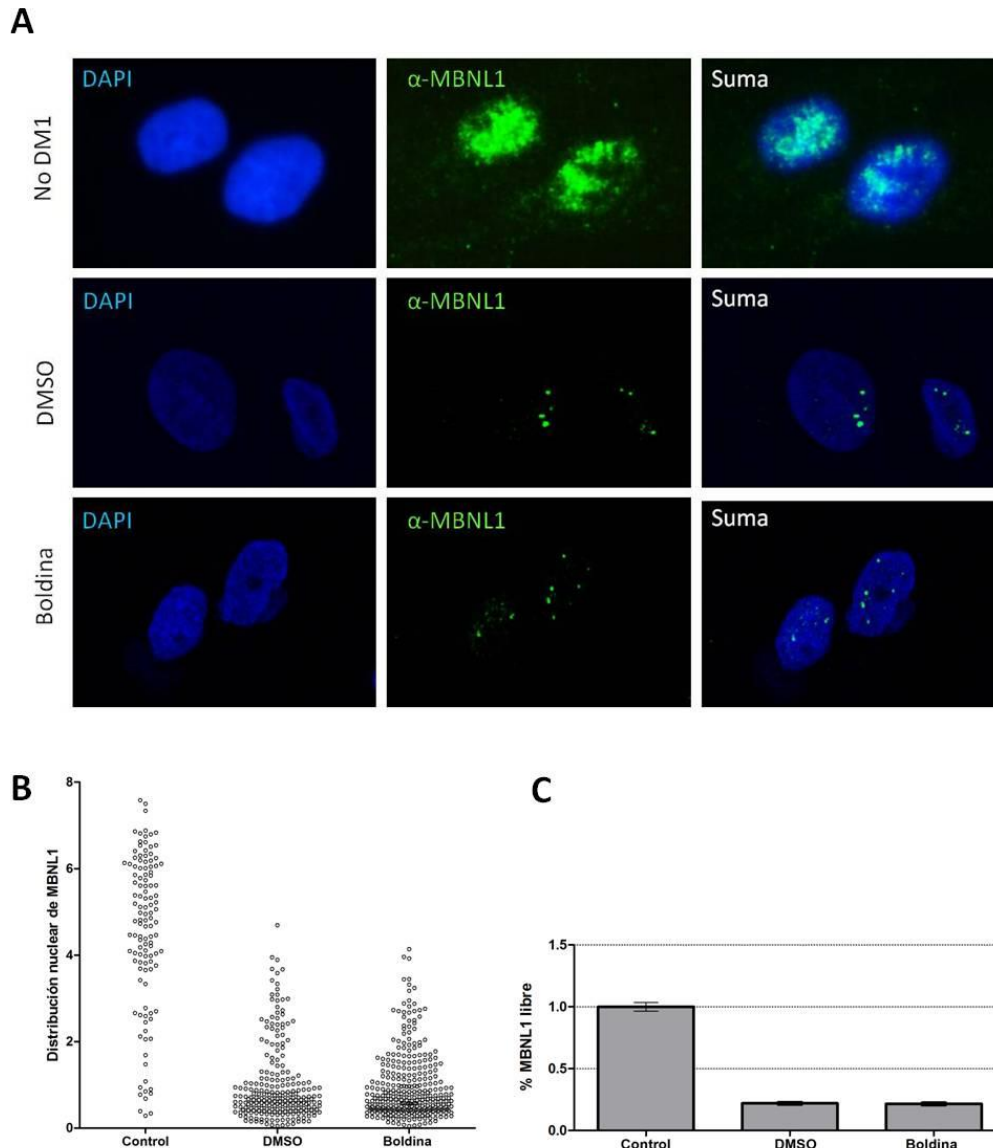


Figura R7. La boldina no cambia la distribución de MBNL1 en el núcleo celular de mioblastos DM1. (A) Detección de MBNL1 mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti MBNL1 en mioblastos derivados de pacientes con 1.333 repeticiones CTG (línea 9.56) tratados durante 24 h con boldina a 100 μ M (Boldina) o con DMSO (1%) (DMSO) y en mioblastos derivados de individuos sanos (No DM1). Los núcleos se muestran marcados con DAPI en azul mientras que MBNL1 se muestra marcado por un anticuerpo específico en verde. (B) Distribución nuclear de MBNL1 cuantificada como pixeles presentes en los dos canales (azul y verde) por área de núcleo, usando imágenes de microscopía confocal y el programa ImageJ. (C) Porcentaje de MBNL1 libre normalizado respecto a la distribución media de MBNL1 en células no DM1. El estudio se llevó a cabo contando al menos 150 núcleos. En ningún caso se detectaron diferencias estadísticamente significativas con el test t de student utilizando el programa GraphPad. Las barras de error corresponden al error estándar.

3.3 La boldina no revierte defectos en el *splicing* de diferentes transcritos en mioblastos de pacientes

Uno de los principales sucesos patogénicos que ocurre en DM1 a nivel molecular, es la desregulación del *splicing alternativo* de numerosos transcritos, alteración que se ha relacionado con varios de los fenotipos observados en pacientes. Los mioblastos transdiferenciados a partir de fibroblastos derivados de pacientes muestran alteraciones en el *splicing* de determinados transcritos como es el exón 22 de los transcritos de la ATPasa dependiente de calcio SERCA. En la población sana dicho exón se excluye en las etapas fetales y se incluye en el adulto. Sin embargo, en pacientes de DM1 el exón 22 se excluye en todo momento, manteniéndose el patrón fetal en los individuos adultos (Kimura *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006). Otro ejemplo característico corresponde a los transcritos de la troponina T cardíaca (cTNT), proteína localizada en los sarcómeros de las fibras musculares rápidas en músculo esquelético. Esta proteína sufre una alteración en su patrón de *splicing* por el que el exón fetal 5, ausente en individuos sanos, se mantiene en pacientes de DM1 (Lin *et al.*, 2006).

Como parte de la caracterización de la actividad anti DM1 de la boldina en modelos celulares, nos propusimos evaluar su capacidad de revertir estos sucesos de *splicing* alterados en un contexto humano. Utilizando mioblastos de pacientes portadores de 1.000 repeticiones CTG (línea 9.66) y mioblastos sanos (línea 9.88), analizamos el *splicing* de los transcritos *cTNT* y *SERCA* de células 9.66 tratadas con boldina a 100 μ M o DMSO (1%) (Fig. R8).

Tras el análisis del porcentaje de inclusión del exón 5 de *cTNT* en células 9.66, el tratamiento con boldina no modificó la inclusión aberrante de dicho exón respecto al tratamiento con DMSO. Así mismo, tampoco se observaron diferencias significativas respecto a la exclusión aberrante del exón 22 de *SERCA* entre mioblastos tratados con boldina o con DMSO por lo que podemos determinar que, a la concentración testada, la boldina no corrige sucesos de *splicing* aberrantes en células de pacientes portadoras de 1.000 repeticiones CTG.

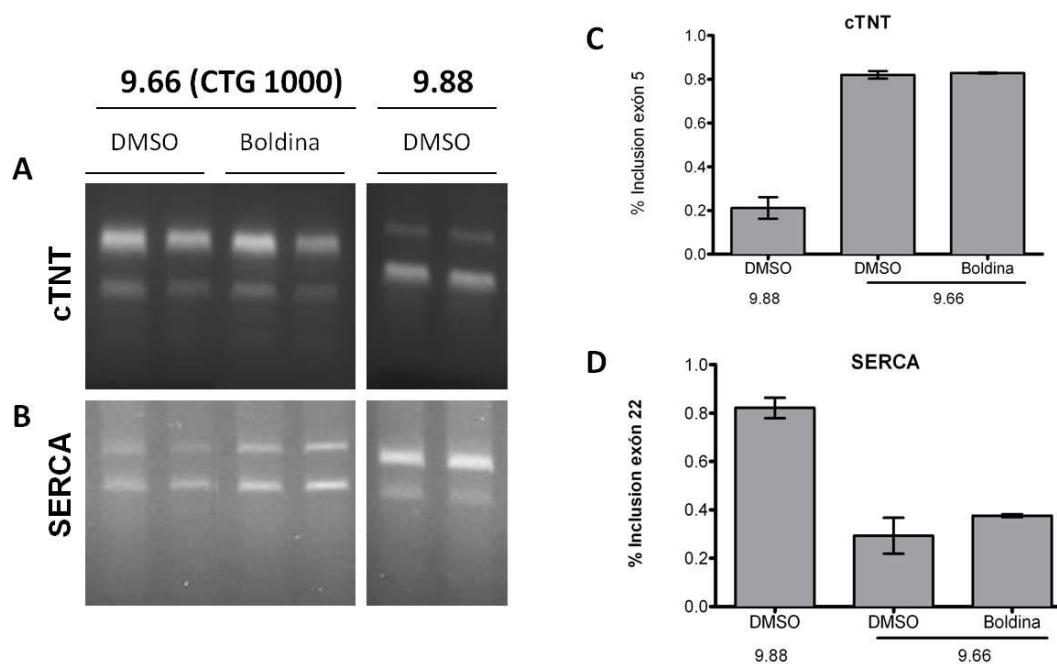


Figura R8. La boldina no revierte el *splicing* aberrante de los transcritos *cTNT* y *SERCA* en mioblastos DM1 portadores de 1000 repeticiones CTG. RT-PCR de los genes *cTNT* (A) y *SERCA* (B) de mioblastos de individuos sanos (línea 9.88) o de pacientes de DM1 (línea 9.66, portadora de 1.000 repeticiones CTG) tratados con boldina (100 μ M) o DMSO (1%). El tratamiento con boldina no disminuye la inclusión del exón 5 (banda inferior) del transcrito *cTNT* tal y como se ve reflejado en los valores de % de inclusión (C) en los que se cuantifica la intensidad de la banda inferior respecto a la superior. Así mismo, no se observa un aumento significativo del % de inclusión del exón 22 de *SERCA* (D). P-valor calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa GrapPhad. Las barras de error corresponden al error estándar.

Tras obtener resultados negativos respecto a la actividad de la boldina sobre el *splicing* de transcritos en células portadoras de 1.000 repeticiones CTG, decidimos medir la eficacia de la boldina en un contexto celular con menos repeticiones tóxicas. Para ello, siguiendo el mismo diseño experimental que el llevado a cabo con las células 9.66, analizamos el *splicing* de los transcritos *cTNT*, *SERCA* mioblastos portadores de 333 repeticiones (línea celular 9.73) tratados con boldina (en concentraciones crecientes) o con DMSO (1%). Además, a fin de aumentar el número de transcritos alterados a analizar, incluimos el análisis del receptor de la insulina (INSR), transcrito en el que la exclusión aberrante del exón 11 en pacientes provoca la expresión de la isoforma IR-A, isoforma con una menor capacidad de señalización (Ho *et al.*, 2004)(Fig. R9).

Tal y como ocurrió con las células 9.66, en mioblastos 9.73 el tratamiento con boldina no revirtió las alteraciones en el *splicing* de los diferentes transcritos. No se observó una disminución de la inclusión aberrante del exón 5 de *cTNT* a ninguna de las concentraciones de boldina testadas. Así mismo tampoco se dieron diferencias significativas en la exclusión aberrante del exón 22 de *SERCA* ni en la inclusión del exón 11 de *INSR*, tras el tratamiento con boldina o con DMSO.

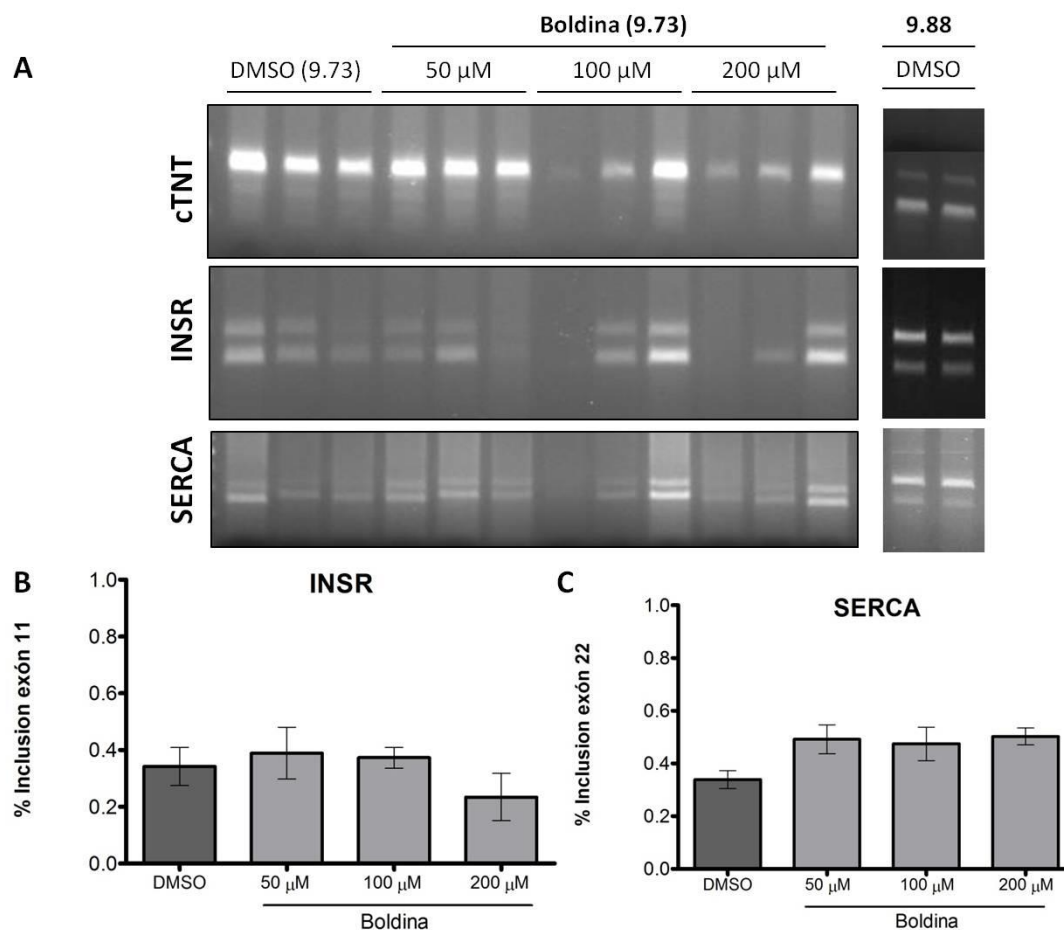


Figura R9. La boldina no revierte el *splicing* aberrante de los transcritos *cTNT*, *SERCA* e *INSR* en mioblastos DM1 portadores de 333 repeticiones CTG. (A) RT-PCT de los genes *cTNT*, *SERCA* e *INSR* de mioblastos DM1 portadores de 333 repeticiones (línea celular 9.73) tratados con boldina (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M) o con DMSO (1%). El tratamiento de células 9.73 con boldina no mejoró la inclusión aberrante del exón 5 de *cTNT* (banda de arriba). El tratamiento con boldina no aumenta significativamente el % de inclusión del exón 22 de *SERCA* tal y como se ve reflejado en los valores de % de inclusión en los que se cuantifica la intensidad de la banda inferior respecto a la superior (B) ni aumenta significativamente el % de inclusión del exón 11 de *INSR* (C). p-valor calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa Graphpad. Las barras de error corresponden al error estándar.

En líneas generales, podemos concluir que aunque el tratamiento con boldina reduce la formación de *foci* en fibroblastos DM1, no cambia la distribución nuclear de MBNL1, ni revierte las alteraciones del *splicing* de diferentes transcritos en mioblastos modelo de la enfermedad, lo que sugiere que la actividad anti DM1 de la boldina podría no estar relacionada con un aumento de proteína MBNL1 libre.

4. Validación de la actividad de la boldina en un modelo murino de DM1

Ya que la boldina redujo la toxicidad de las repeticiones CTG en diferentes modelos de DM1 en *Drosophila* y tras los datos obtenidos en células de pacientes respecto a la capacidad de la boldina de actuar a nivel molecular sobre los *foci* ribonucleares, decidimos estudiar la actividad de la boldina en un modelo murino de DM1. El modelo murino seleccionado fue el ratón HSA^{LR}, un modelo bien descrito que se ha utilizado tanto para la elucidación de las bases moleculares de la enfermedad como para el estudio de la actividad anti DM1 de diferentes compuestos (Mankodi *et al.*, 2000; Foff y Mahadevan, 2011). Estos ratones HSA^{LR}, cedidos a nuestro laboratorio por el Profesor Charles Thornton (Universidad de Rochester, Nueva York, EEUU), expresan 250 repeticiones CUG en los transcritos heterólogos de la actina humana y reproducen síntomas musculares y funcionales de la Distrofia Miotónica de tipo 1 tales como la formación de *foci* ribonucleares, alteraciones en el *splicing* de transcritos y miotonia (Mankodi *et al.*, 2000).

El objetivo de este estudio en modelos murinos fue validar la actividad de la boldina a nivel molecular en un modelo de ratón DM1, y estudiar la capacidad de la boldina de actuar a nivel funcional reduciendo los niveles de miotonía.

4.1 La boldina reduce la formación de *foci* ribonucleares en ratones modelo de DM1

Como un primer estudio de la eficacia de la boldina en ratones HSA^{LR}, nos propusimos repetir aquél ensayo en el que la boldina resultó eficaz tanto en *Drosophila* como en células provenientes de pacientes, por lo que analizamos la actividad de la boldina sobre la formación de *foci* ribonucleares en ratones DM1.

A fin de minimizar el impacto en los resultados debido a la variabilidad propia del modelo de ratón, previamente en nuestro laboratorio caracterizamos los ratones HSA^{LR} a nivel molecular observando un aumento del 20% en la variabilidad de los resultados obtenidos en ratones de ocho semanas (datos no mostrados). Por ello, en los diferentes ensayos incluidos en este apartado, seleccionamos ratones de entre cuatro y seis semanas de edad.

El tratamiento con boldina a los ratones HSA^{LR} se llevó a cabo mediante inyecciones intramusculares del compuesto a dos concentraciones: 60 mg/kg y 25 mg/kg (60 mg/kg fue la concentración máxima a la que pudimos inyectar el compuesto sin que aparecieran signos de toxicidad graves). El compuesto fue inyectado en el cuádriceps izquierdo de la pata trasera. El cuádriceps derecho, se utilizó como control interno por lo que se le inyectó el vehículo en el que se disolvió la boldina (suero salino y 20% DMSO). Los ratones fueron tratados diariamente con el compuesto o con DMSO

durante tres días consecutivos y sacrificados dos días después de la administración de la última dosis.

En aquellos ratones tratados con boldina a 60 mg/kg, el análisis mediante hibridación *in situ* fluorescente mostró una reducción del número de núcleos con *foci* en el cuádriceps tratado con boldina (15%) frente al número de núcleos con *foci* en el cuádriceps tratado con DMSO (49%) (Fig. R10). Este efecto de la boldina se dio en el 50% de los ratones tratados (n=6). Así mismo, el tratamiento con boldina a 25 mg/kg provocó una reducción del número de núcleos con *foci* en los cuádriceps donde se inyectó el compuesto (12%) no observada tras la inyección de DMSO (49% de núcleos con *foci*) (Fig. R10), en el 66% de los ratones tratados (n=3). El número de células con *foci* en los músculos tratados con DMSO fue similar al observado en ratones HSA^{LR} de ese rango de edad (datos no mostrados).

Estos resultados muestran que tal y como sucede en *Drosophila* y en células derivadas de pacientes, la boldina es capaz de reducir de forma estadísticamente significativa el número de *foci* ribonucleares en el cuádriceps de ratones modelo de DM1 tras su administración intramuscular.

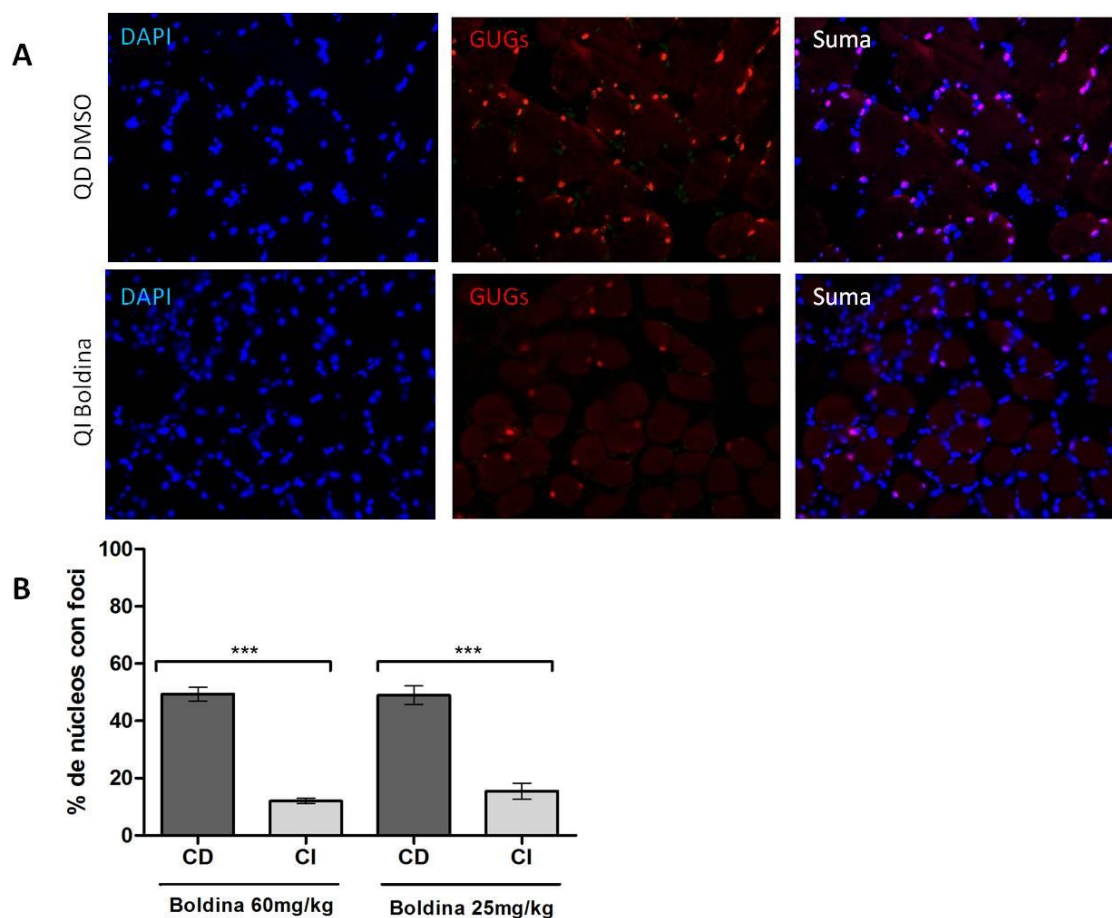


Figura R10. La boldina reduce la formación de *foci* ribonucleares en ratones HSA^{LR}. (A) Hibridación *in situ* fluorescente mostrando los *foci* ribonucleares en cortes transversales de cuádriceps de las patas traseras de ratones tratados con boldina a 60 mg/kg en el cuádriceps izquierdo (QI Boldina) y con DMSO

(20%) en el cuádriceps derecho (QD DMSO). Los ratones fueron tratados diariamente con el compuesto o con DMSO durante tres días consecutivos y sacrificados dos días después de la administración de la última dosis. Los núcleos se muestran marcados con DAPI en azul mientras que los *foci* se muestran marcados por la sonda CAG en rojo. (B) Cuantificación del número de núcleos con *foci* en secciones de cuádriceps tras el tratamiento con Boldina a 60 mg/kg y 25 mg/kg o con DMSO ***p-valor<0.001. Las cuantificaciones del número de núcleos con *foci* se llevó a cabo contando al menos 150 núcleos. P-valor calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa GrapPhad. Las barras de error corresponden al error estándar.

4.2 La boldina no revierte defectos en el *splicing* del transcrito *Serca* en ratones modelo de DM1 HSA^{LR}

Aunque la boldina no restauró los defectos en el *splicing* de diferentes transcritos en mioblastos provenientes de pacientes, decidimos evaluar si esta falta de actividad observada se debía a las condiciones en las que se testó en el modelo celular, o si por el contrario estos resultados eran debidos al compuesto. Para ello, nos propusimos evaluar la capacidad de la boldina de restaurar defectos en el *splicing* de transcritos alterados en otro modelo de DM1; el ratón HSA^{LR}.

De entre los diferentes transcritos que se encuentran alterados en el ratón HSA^{LR}, inicialmente seleccionamos el exón 22 de los transcritos de la ATPasa dependiente de calcio *Serca* por ser uno de los ejemplos más claros de *splicing* alterado tanto en pacientes como en ratón HSA^{LR}. Cabe recordar que en la población sana dicho exón se excluye en las formas fetales y se incluye en el adulto. Sin embargo, en pacientes de DM1 el exón 22 se excluye en todo momento, manteniéndose el patrón fetal en los individuos adultos.

Con el fin de determinar si la boldina aumenta el porcentaje de inclusión del exón 22 del transcrito *Serca*, en un primer tratamiento, en ratones de entre cuatro y seis semanas de edad, inyectamos boldina a diferentes concentraciones: 60 mg/kg, 50 mg/kg, 25 mg/kg, 12.5 mg/kg y 6.25 mg/kg con un número de 3 a 6 ratones por concentración. El compuesto se inyectó en el cuádriceps izquierdo de la pata trasera. El cuádriceps derecho se utilizó como control interno inyectando DMSO (20%). Los ratones fueron tratados diariamente con el compuesto o con DMSO durante tres días consecutivos y sacrificados dos días después de la administración de la última dosis.

En un segundo tratamiento, valoramos la eficacia de la boldina en el ratón tras un mayor tiempo de exposición tratando ratones HSA^{LR} con una dosis de boldina durante dos semanas. Durante la primera semana, administramos el compuesto los ratones en el primer, segundo, tercero y quinto día, alargando el tratamiento una segunda semana en la que esos mismos ratones fueron tratados con el compuesto o con DMSO durante los tres primeros días y sacrificados al quinto día (n=6).

A fin de minimizar la variabilidad observada en ratones HSA^{LR} para el *splicing* de este transcrito, en ambos casos, como control se utilizaron animales sanos FVB, línea con el mismo fondo genéticos que HSA, sin tratar así como ratones HSA^{LR} en los que se inyectó suero con 20% de DMSO en las dos extremidades.

El análisis mediante RT-PCR de los transcritos de *Serca* de animales tratados con boldina y DMSO no reveló cambios significativos en la inclusión del exón 22 a ninguna de las concentraciones ensayadas (geles de las concentraciones 50 mg/kg, 25 mg/kg, 12.5 mg/kg y 6.25 mg/kg no mostrados) en los tratamientos de una y dos semanas (Fig. R11).

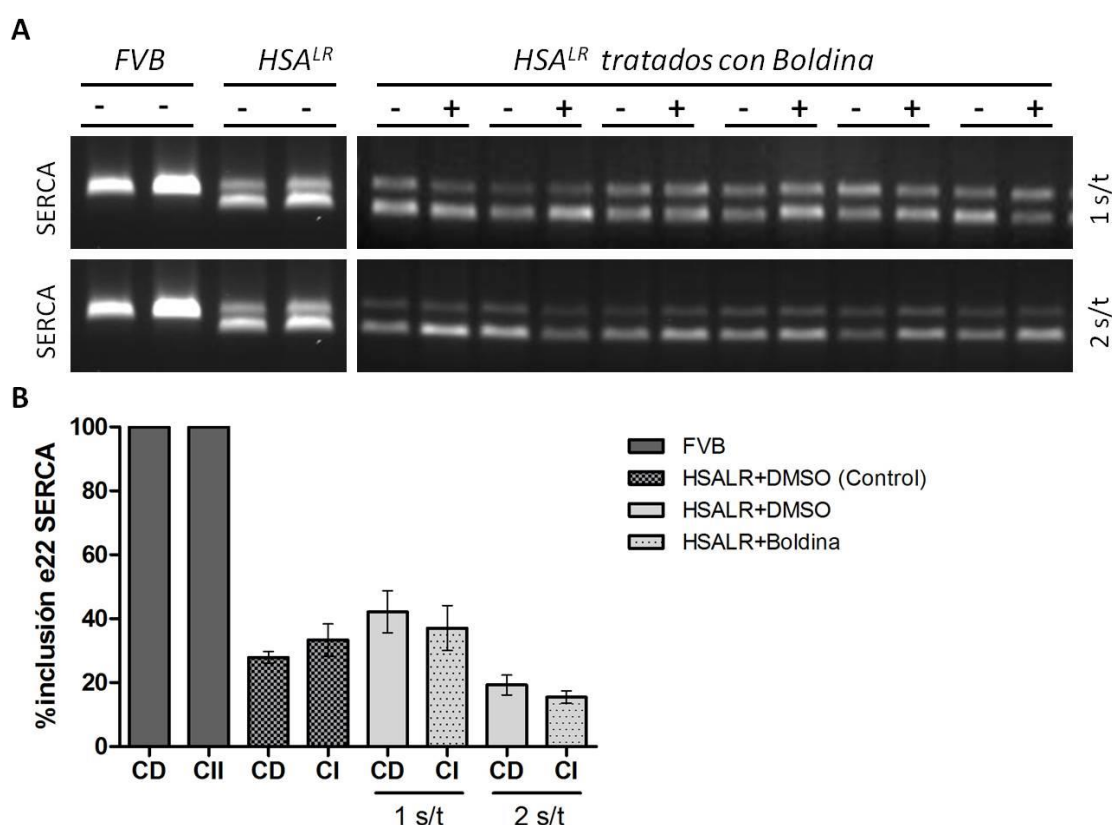


Figura R11. La boldina no revierte el *splicing* aberrante del transcrito *Serca* en ratones HSA^{LR}. (A) Gel representativo de la RT-PCR del gen *Serca* de ratones HSA^{LR} tratados con boldina a 60 mg/kg en el cuádriceps izquierdo y con DMSO (20%) en el cuádriceps derecho (n=6), y de los cuádriceps derecho e izquierdo de ratones FVB (n=2) y HSA^{LR} (n=6) en los que se inyectó DMSO en ambos cuádriceps. Se muestran los resultados de los tratamientos de una y dos semanas de duración. (B) Cuantificación del % de inclusión del exón 22 de *Serca* en el que se mide la intensidad de la banda superior respecto al total. El tratamiento con boldina no aumenta el % de inclusión de exón 22 en los tratamientos de 1 y 2 semanas. Las barras de error corresponden al error estándar.

4.3 La boldina no mejora defectos en el *splicing* del transcrito *Clcn1* en ratones modelo de DM1 HSA^{LR}

Tras los resultados negativos obtenidos respecto a la capacidad de la boldina de restaurar el *splicing* del transcrito *Serca*, decidimos evaluar si esta falta de actividad se limitaba al transcrito *Serca* o si era independiente del transcrito, analizando la actividad de la boldina sobre otro transcrito alterado en DM1.

De entre los numerosos transcritos que se encuentran alterados en ratones DM1, seleccionamos el *splicing* del canal de cloro de tipo 1 (*Clcn1*). Durante el procesado del mensajero, en ratones, al igual que en los pacientes, además del intrón 2 se incorpora el exón 7a, ambos portadores de un codón de stop prematuro (Lueck *et al.*, 2007). Dicha inclusión da lugar a una proteína trunca y a una disminución de proteína CLCN1 funcional (Charlet *et al.*, 2002; Mankodi *et al.*, 2002), lo que se relaciona con la miotonía presente en DM1.

En un estudio complementario al experimento 4.2, analizamos la exclusión del exón 7a del transcrito *Clcn1* en aquellos ratones incluidos en el tratamiento con boldina a 60 mg/kg de una semana de duración anteriormente descrito.

El análisis mediante RT-PCR de los transcritos *Clcn1* de animales tratados con boldina y DMSO no reveló cambios significativos en la exclusión del exón 7a (Fig. R12), lo que indica que el tratamiento intramuscular con boldina no restaura los defectos de *splicing* de al menos dos transcritos diferentes alterados en el ratón HSA^{LR}.

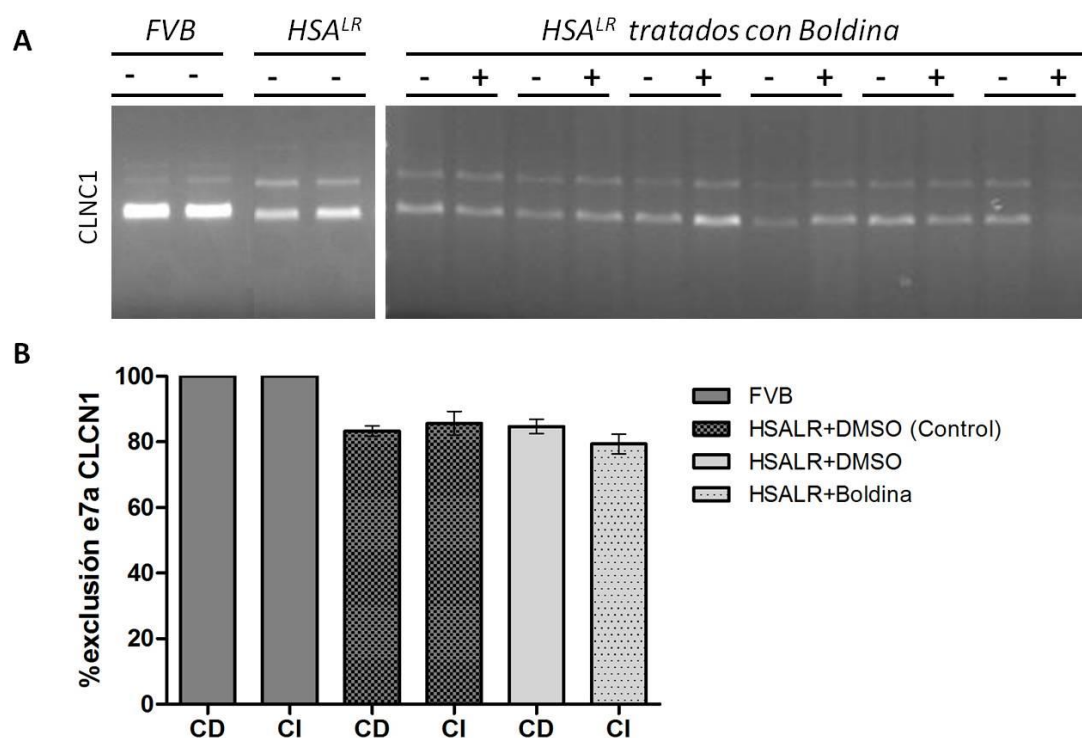


Figura R12. La boldina no revierte el *splicing* aberrante del transcrito *Clcn1* en ratones HSA^{LR}. (A) Gel representativo de la RT-PCR del gen *Clcn1* de ratones HSA^{LR} tratados con boldina a 60 mg/kg en el

cuádriceps izquierdo y con DMSO (20%) en el cuádriceps derecho (n=6), y de los cuádriceps derecho e izquierdo de ratones FVB (n=2) y HSA^{LR} (n=6) en los que se inyectó DMSO en ambos cuádriceps. (B) Cuantificación del % de exclusión del exón 7a de *Clcn1* en el que se mide la intensidad de la banda inferior respecto a la del total. Las barras de error corresponden al error estándar.

Tal y como sucede en modelos celulares de DM1, la boldina actúa sobre los *foci* ribonucleares pero no mejora las alteraciones en el *splicing* de transcritos en ratones modelo de la enfermedad, lo que podría relacionarse con el hecho de que la actividad anti DM1 de la boldina pueda ser debida a un mecanismo de acción aguas abajo de las repeticiones CUG.

4.4 La boldina disminuye el grado de miotonía en ratones modelo de DM1

Tras haber estudiado la actividad de la boldina en varios ensayos a nivel molecular en el ratón DM1, decidimos evaluar simultáneamente el efecto de la boldina sobre un fenotipo funcional de la enfermedad.

La miotonía o incapacidad para relajar un músculo es un síntoma característico de la DM1. Tal y como sucede en pacientes, los ratones HSA^{LR} desarrollan miotonía a partir de las cuatro semanas de edad (Mankodi *et al.*, 2000). Dado que en ratones DM1, la miotonía puede medirse mediante electromiografía, evaluamos el efecto de la boldina sobre la miotonía en ratones HSA^{LR} de seis semanas de edad.

El diseño experimental empleado se basó, como en experimentos anteriores, en la inyección intramuscular en el cuádriceps izquierdo de las patas posteriores, de distintas concentraciones de boldina. Así mismo, en el cuádriceps derecho se inyectó DMSO (20%). Los animales fueron tratados diariamente durante tres días realizando electromiogramas antes de inyectar por primera vez el compuesto, y dos días después de haber inyectado la última dosis. Tal y como esperábamos, el grado de miotonía antes de comenzar el tratamiento fue exactamente igual para el cuádriceps derecho e izquierdo (Fig. R13A). Los valores de miotonía del cuádriceps derecho, tratado únicamente con el vehículo, se mantuvieron altos durante todo el experimento. Sin embargo, las medidas de miotonía del cuádriceps izquierdo, tratado con boldina, se redujeron considerablemente dos días después de la administración de la última dosis (Fig. R13B). Como control se utilizaron ratones tratados con el vehículo en ambas patas, obteniendo como resultado valores altos de miotonía en ambos cuádriceps.

Los resultados obtenidos mostraron que la boldina reduce los niveles de miotonía en ratones modelo de DM1, además, cabe destacar que esta disminución en los niveles de miotonía es dependiente de dosis, ya que la mayor disminución de la miotonía se observó a las dosis más altas administradas.

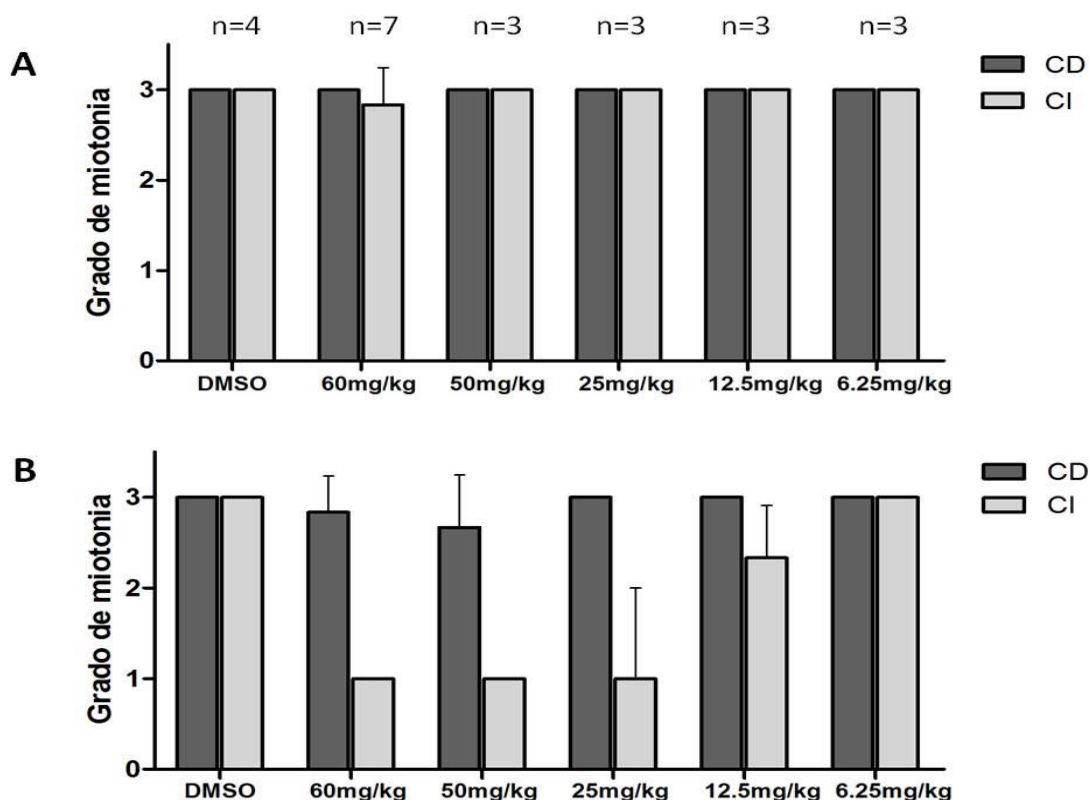


Figura R13. La boldina disminuye el grado de miotonía en ratones HSA^{LR}. (A) Niveles de miotonía en ratones HSA^{LR} antes de iniciar el tratamiento. El grado de miotonía se representa en una escala donde 0 significa ausencia de miotonía y 3 presencia de miotonía en el 90% de los puntos analizados o más. Se muestra el número de ratones utilizado en cada concentración (n). (B) Valores de miotonía de ratones HSA^{LR} 2 días después del tratamiento intramuscular con boldina a diferentes concentraciones en el cuádriceps izquierdo (CI) o con el vehículo (DMSO 20%) en cuádriceps derecho (CD). Como control se utilizaron ratones en los que se inyectó el vehículo en ambos cuádriceps (DMSO). Las barras de error representan el error estándar

Dados los resultados positivos en la reducción de la miotonía asociada a la administración intramuscular de la boldina, medimos la eficacia de la boldina sobre dicho parámetros tras una administración a nivel sistémico. En varios experimentos, administramos diferentes concentraciones de boldina de forma intraperitoneal (30 mg/Kg) e intragástrica, (25 mg/kg) en un número de entre 3 y 6 ratones por concentración. Analizamos los niveles de miotonía, a corto plazo, tras la administración de la boldina por ambas vías. En ningún caso la boldina redujo los niveles de miotonía durante los 5 primeros días tras el tratamiento. En un ensayo a largo plazo, medimos los niveles de miotonía durante los 21 días posteriores al tratamiento con boldina por vía intraperitoneal obteniendo resultados negativos respecto a la reducción de la miotonía (datos no mostrados). El hecho de que la boldina resulte activa en ratones DM1 únicamente tras una administración intramuscular, da pie a pensar que tanto distribución de este compuesto como otra de las propiedades farmacocinéticas que se dan en la globalidad un organismo puedan ser limitadas.

4.5 La boldina provoca una mayor disminución de la miotonía que el antiarritmico mexiletine en ratones DM1

En la práctica clínica, algunos pacientes de DM1 con un especial trastorno miotónico suelen ser tratados, entre otros, con antiarritmicos de clase Ib (Trip *et al.*, 2006). Entre dichos fármacos, destaca el uso del mexiletine, considerado en algunos estudios como un antimiotónico efectivo en el tratamiento de la DM1 (Kweiecinski *et al.*, 1992; Logigian *et al.*, 2010).

Dado que la boldina reduce la miotonía en el modelo de ratón DM1, decidimos llevar a cabo un estudio comparativo de la actividad antimiotónica de la boldina respecto a la del mexiletine, fármaco utilizado como antimiotónico en DM1.

Siguiendo el mismo diseño experimental que en ensayos anteriores, seleccionamos ratones HSA^{LR} de seis semanas de edad para medir el efecto antimiotónico de ambos compuestos. En un primer experimento, los ratones fueron tratados con una inyección intramuscular, en el cuádriceps izquierdo de las patas posteriores, con mexiletine o boldina, ambos a una concentración de 60 mg/kg (n=4). El cuádriceps derecho se utilizó como control inyectando el vehículo en el que se disolvieron ambos compuestos (DMSO 20%). Los animales fueron tratados diariamente durante tres días realizando electromiogramas antes de inyectar por primera vez los compuestos, y dos días después de haber inyectado la última dosis. Antes de comenzar el tratamiento, el nivel de miotonía en la pata derecha fue alto en todos los animales (datos no mostrados), sin embargo, tras el tratamiento con mexiletine y boldina, el nivel de miotonía en el cuádriceps derecho disminuyó en el 100% de los animales tratados con boldina y en el 75% de los animales tratados con mexiletine, siendo mayor la disminución de la miotonía provocada por la boldina (Fig. R14A).

A fin de evaluar cuánto tiempo dura el efecto antimiotónico de ambos compuestos, continuamos midiendo durante 15 días los niveles de miotonía de los ratones tratados con mexiletine o boldina. Los datos recogidos mostraron que el efecto de la boldina no sólo es mayor que el del mexiletine sino que además se mantiene durante un mayor tiempo (Fig. R14B).

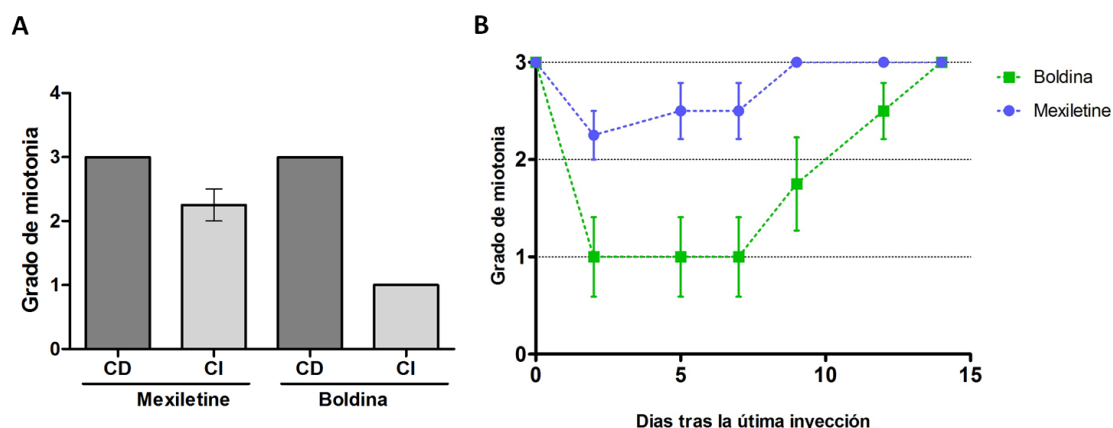


Figura R14. La boldina provoca una mayor disminución de la miotonía que el antiarrítmico mexiletine en ratones DM1. (A) Niveles de miotonía en ratones HSA^{LR} 2 días después del tratamiento intramuscular con mexiletine (n=4) o boldina (n=4) a 60 mg/km en el cuádriceps izquierdo (CI) o con el vehículo (DMSO 20%) en cuádriceps derecho. El grado de miotonía se representa en una escala donde 0 significa ausencia de miotonía y 3 presencia de miotonía en el 90% de los puntos analizados o más. (B) Valores de miotonía del cuádriceps izquierdo de ratones HSA^{LR} tratados con boldina o mexiletine medidos entre los 0 y 15 días tras el tratamiento. Las barras de error representan el error estándar

4.6 La boldina reduce los niveles de miotonía en un modelo de miotonía inducida en ratón

Según los resultados obtenidos anteriormente, el tratamiento con boldina reduce la miotonía en ratones HSA^{LR} sin que esta reducción esté asociada a una reversión en el *splicing* de Clcn1 (Fig. R12). Por ello, a fin de determinar si la actividad antimiotónica de la boldina es independiente al mecanismo de patogénesis de la DM1, analizamos la eficacia de esta molécula en un modelo de miotonía inducible en ratón.

El tratamiento en ratones con el compuesto ácido antraceno-9-carboxílico (9-AC), mediante el bloqueo del canal CLCn1, induce un estado de miotonía similar al observado en el modelo HSA^{LR}, producido por el bloqueo del canal de cloro (Bryant y Morales-Aguilera, 1971; Estevez *et al.*, 2003). Tras la administración del 9-AC, la miotonía inducida puede ser observada y medida mediante la cuantificación en segundos del tiempo de reflejo de reposicionamiento (TRR), que es el tiempo que tarda un ratón en darse la vuelta sobre sus cuatro patas tras ser colocado en una posición supina. Según este modelo de miotonía inducible, un compuesto antimiotónico será capaz de reducir el TRR inducido por el 9-AC (Desaphy *et al.*, 2013) (Fig. R15).

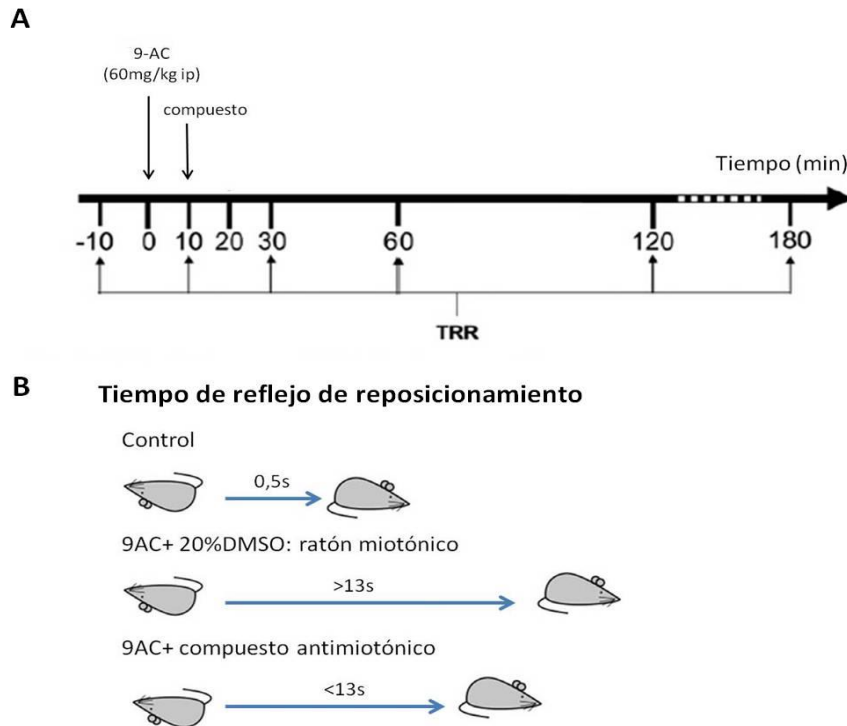


Figura R15. Esquema de un ensayo de TRR. (A) La medida de la miotonía se realiza mediante el registro del tiempo de reflejo de reposicionamiento (TRR), que es el tiempo que tarda un ratón en darse la vuelta sobre las cuatro patas tras una posición supina. El compuesto objeto de estudio es administrado 10 min tras la inyección intraperitoneal del 9-AC. El TRR se mide 10 min antes y 30, 60, 120 y 180 min tras la inyección del 9-AC. En cada punto, el valor de TRR se calcula como la media de 10 medidas, dejando un minuto de separación entre cada medida. (B) En condiciones control (antes de la inyección del 9-AC), el TRR es de menos de 0.5 s. Tras la administración del 9-AC junto con el vehículo (DMSO), el TRR aumenta a más de 13 segundos. Según este diseño experimental, un compuesto antimiotónico reducirá el TRR a menos de 13 segundos (Desaphy *et al.*, 2013)

A fin de validar la actividad antimiotónica de la boldina en un modelo de miotonía inducible, siguiendo el diseño experimental anteriormente descrito, administramos de forma intragástrica 10 mg/kg del compuestos boldina. Como control positivo utilizamos el compuesto mexiletine, compuesto descrito como positivo en este ensayo (Camerino *et al.*, 2013). Al igual que la boldina, el mexiletine fue administrado de forma intragástrica a una concentración de 10 mg/kg. El TRR de los ratones tratados con ambos compuestos se redujo, quedando así validada su capacidad antimiotónica en un modelo de miotonía inducible (Fig. R16). Cabe remarcar que en este caso la disminución del TRR en los ratones tratados con mexiletine fue mayor que la observada en los ratones tratados con boldina.

Los resultados derivados de este experimento confirman que la actividad antimiotónica de la boldina es independiente a la presencia de las expansiones CTG, lo que junto con los datos de distribución de MBNL y *splicing*, sugiere que este compuesto podría tener un mecanismo de acción independiente a la interacción con las repeticiones tóxicas presentes en la DM1.

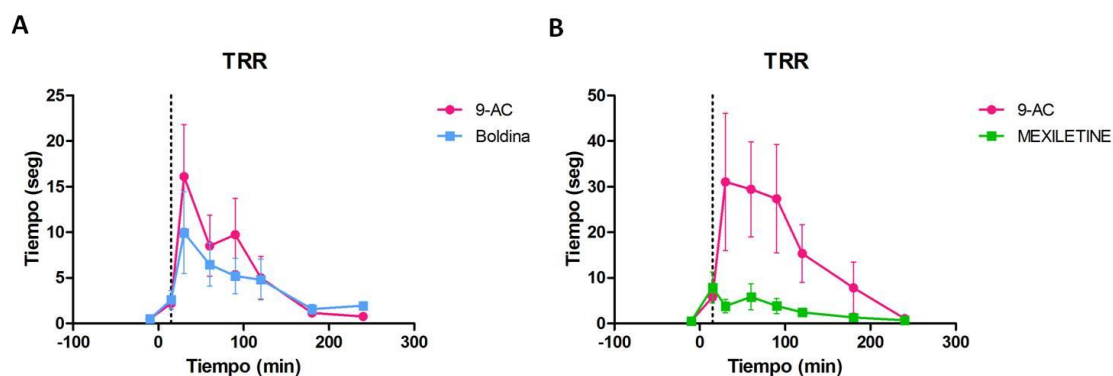


Figura R16. El tratamiento con boldina y mexiletine reduce el tiempo de respuesta de reposicionamiento (TRR) en ratones modelo de miotonía inducible. Medidas del TRR en ratones control a los 30, 60, 90, 120 y 180 min tras la inyección de 9-AC (60 mg/kg) junto con el vehículo DMSO (20%)(n=9), y en ratones tratados con 9AC (60 mg/kg) y (A) boldina (10 mg/kg, administración intragástrica) o (B) mexiletine (10 mg/kg, administración intragástrica) (n=7-9). La boldina y el mexiletine redujeron estadísticamente el TRR en los ratones tratados con un P-valor<0.05. Cada curva muestra la media más la desviación típica del TRR de 7-9 ratones. P-valor calculado mediante el análisis de varianza ANOVA de una vía seguido del test t de student no pareado utilizando el programa GrapPhad.

5. Estudio del mecanismo de acción de la boldina

5.1 La boldina no se une a las repeticiones CUG *in vitro*

Siguiendo con el segundo objetivo de este trabajo nos propusimos determinar el mecanismo por el que la boldina revierte ciertos fenotipos DM1 en diferentes modelos de la enfermedad.

Tal y como se ha descrito al inicio de este capítulo, la boldina tiene una estructura química similar a la estefenantrina (Fig R1). Dado que la estefenantrina es capaz de unirse a la horquilla de RNA formada por las repeticiones CUG (García Alcover, 2015), decidimos estudiar si dado su similitud estructural, el mecanismo de acción de la boldina también estaba basado en la unión a las repeticiones tóxicas. Para estudiar si la boldina se une a las repeticiones CUG se realizaron ensayos de retardo en gel y de fluorescencia polarizada.

En el ensayo de retardo en gel, se testó la capacidad de la boldina para interactuar con el RNA 4-CUG marcado con carboxifluoresceína (FAM-CUG4), RNA de cuatro repeticiones capaz de formar la horquilla de doble cadena patogénica (Warf *et al.*, 2009). Dado que la interacción entre la boldina y el RNA marcado habría provocado una disminución en la banda correspondiente al RNA libre en el gel, al no observarse la disminución de dicha banda, podemos concluir que la boldina no se une al FAM-CUG4

(Fig.R17). Así mismo, tampoco observamos FAM-CUG4 retenido en el pocillo a ninguna de las concentraciones de boldina ensayadas.

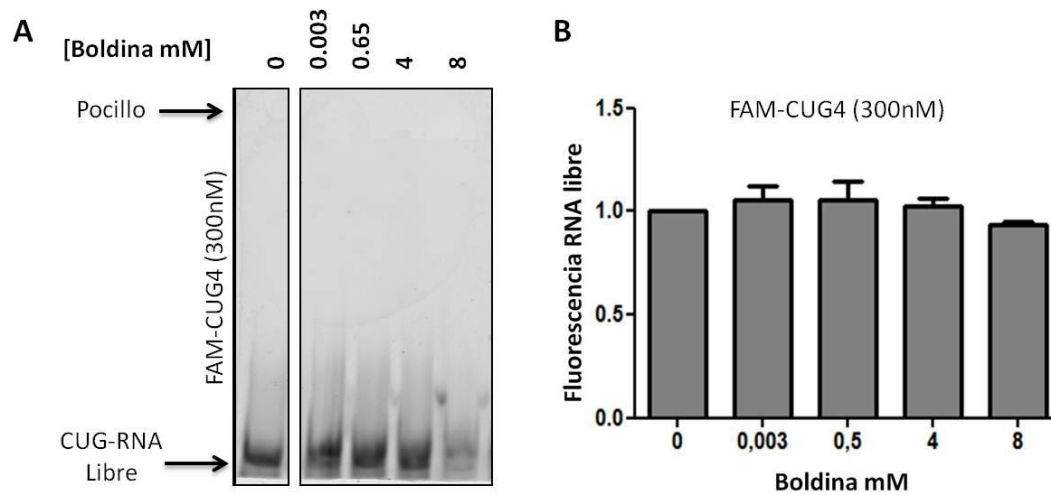


Figura R17. La boldina no se une a las repeticiones CUG en un ensayo de retardo en gel. (A) Ensayos de retardo en gel en los que se no se observa RNA formado por 4 repeticiones CUG marcado con FAM retenido en el pocillo del gel a ninguna de las concentraciones de boldina ensayadas. (B) Cuantificación del RNA fluorescente libre en la que no se ve la disminución del RNA fluorescente libre tras la adición de boldina a varias concentraciones. Las barras de error corresponden al error estándar

Una segunda aproximación a la unión de la boldina a RNA formado por las repeticiones tóxicas *in vitro*, fue el ensayo de fluorescencia polarizada (FP). La Fluorescencia Polarizada se basa en la emisión de luz por un fluoróforo excitado. Las muestras son excitadas por luz polarizada seleccionada por filtros de polarización específicos, sin embargo, la luz emitida estará polarizada o no, dependiendo de la movilidad de las moléculas fluorescentes en el pocillo. Las moléculas grandes, rotarán lentamente y emitirán luz polarizada al ser excitadas por luz polarizada. Las moléculas más pequeñas emitirán luz despolarizada. Niveles bajos de polarización indican que las moléculas fluorescentes se mueven libremente en la solución, mientras que niveles altos de polarización implican la presencia de un complejo molecular grande. De esta manera, midiendo los cambios en la polarización de un ARN formado por 23 repeticiones CUG conjugado al fluoróforo carboxifluoresceína, (FAM-CUG23) podríamos estudiar la unión entre la boldina y este RNA marcado (Mao *et al.*, 2006).

Estudiamos la fluorescencia polarizada del RNA FAM-CUG23 en presencia de la boldina a diferentes concentraciones. Como control positivo, utilizamos la pentamidina, una pequeña molécula utilizada comúnmente como anti fúngico, capaz de desplazar a MBNL1 en la unión a las repeticiones (Warf *et al.*, 2009) y como control negativo utilizamos FAN-CUG23 en presencia de DMSO. Aunque observamos un aumento de la

polarización estadísticamente significativo en presencia de la pentamidina, en estos ensayos, la boldina no causó un incremento en la FP de FAM-CUG23 (Fig. R18).

Los resultados obtenidos tanto en los estudios de retardo en gel como en el ensayo de fluorescencia polarizada, indican que la boldina no se une al RNA formado por las repeticiones CUG *in vitro*, lo que apoya la tesis sobre un mecanismo de acción para esta molécula independiente a las repeticiones tóxicas.

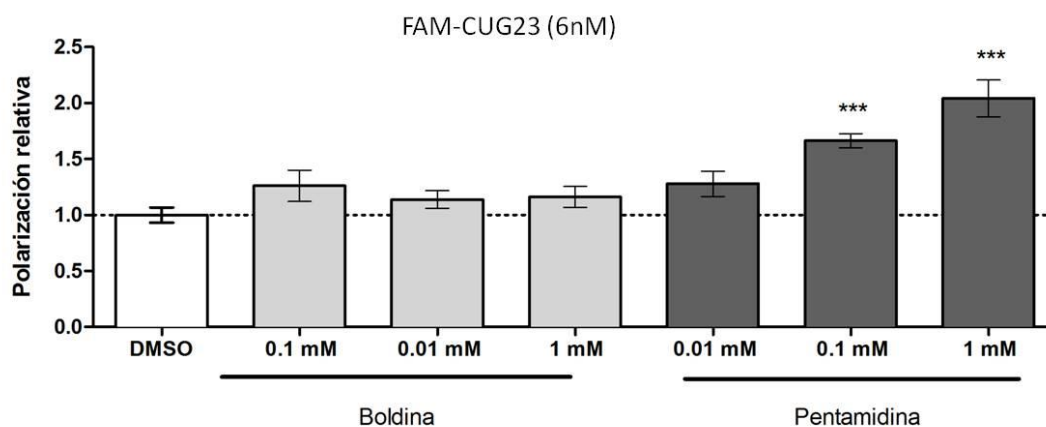


Figura R18. La boldina no se une a las repeticiones CUG en un ensayo de fluorescencia polarizada. La adición de pentamidina a las mayores concentraciones causó un incremento en la polarización de FAM-CUG23 provocado por la unión entre ambas moléculas. La adición de boldina no provocó un aumento en la polarización de FAM-CUG23 respecto al control negativo (DMSO) en ninguna de las concentraciones utilizadas. *** p-valor<0.001 calculado con el test t de student no pareado utilizando el programa GraphPad. Las barras de error corresponden al error estándar.

5.2 La boldina no afecta a la expresión de MBNL1 y DMPK

Tras conocer que la actividad de la boldina observada en diferentes modelos de DM1 podría no estar ligada a su unión a las repeticiones CUG, decidimos estudiar si su mecanismo de acción es debido a un aumento de los niveles de expresión de MBNL1 o a una disminución de la expresión de DMPK, ambos relacionados con el mecanismo de patogénesis de la enfermedad.

Para ello, medimos de forma cuantitativa mediante qRT-PCR los niveles de expresión de MBNL1 y DMPK en mioblastos de pacientes tratados con boldina a 100 μ M o con DMSO (1%). Los niveles de expresión de MBNL1 y DMPK no mostraron cambios tras el tratamiento con boldina (Fig.R19), lo que sugiere que no existe un mecanismo de acción de la boldina ligado a variaciones en la expresión de los mRNAs de MBNL1 y DMPK

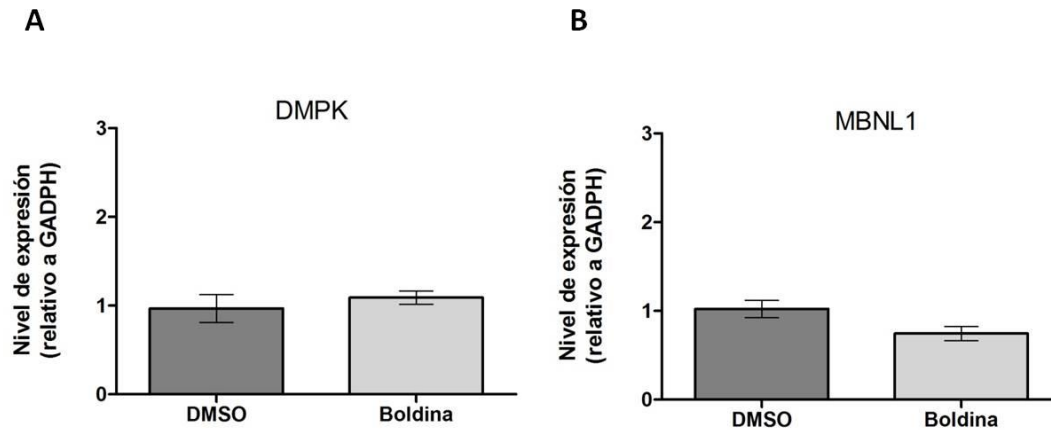


Figura R19. El tratamiento con boldina no afecta a los niveles de expresión de DMPK y MBNL1. qRT-PCT de DMPK (A) y MBNL1 (B) en mioblastos de pacientes tratados con DMSO (1%) (DMSO) o boldina a 100 μ M (Boldina) normalizada según la expresión de GAPDH. En ambos casos, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre mioblastos tratados con boldina o con DMSO. Las barras de error corresponden al error estándar.

5.3 Estudio de la actividad de la boldina sobre diferentes canales de membrana

Los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* mostraron que la boldina puede tener un mecanismo de acción no ligado a la regulación de factores moleculares clave en la ruta de pato génesis de la DM1.

Ya en 1993, D'Ocon y colaboradores publicaron un estudio en el que ponían de manifiesto la interacción de la boldina con el canal de calcio (D'Ocon *et al* 1993). Además, el hecho de que la actividad antimiotónica de esta molécula fuera similar a la del mexiletine, un inhibidor de los canales de sodio, nos sugirió que la boldina podría tener un mecanismo de acción ligado a canales de membrana. Por ello, nos propusimos analizar su actividad sobre diferentes canales iónicos.

En colaboración con el Instituto Teófilo Hernando (Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid) caracterizamos el potencial efecto modulador de los compuestos boldina (llamado VLT-015 en esta colaboración) y mexiletine sobre diferentes corrientes iónicas. Como modelo experimental se utilizaron células cromafines de la glándula adrenal bobina.

5.3.1 Efecto de la boldina y el mexiletine sobre corrientes de entrada a través de canales de sodio (Na^+) dependientes de voltaje

Para determinar si la boldina y el mexiletine afectaban a corrientes de entrada a través de canales de sodio dependientes de voltaje (I_{Na}), llevamos a cabo estudios

electrofisiológicos mediante la técnica patch-clam convencional en la variante de célula entera en células cromafines bovinas. La boldina, provocó un bloqueo de I_{Na} estadísticamente significativo a la máxima concentración estudiada (100 μM). Por el contrario, el mexiletine causó un bloqueo parcial de la corriente sin ser estadísticamente significativo (Fig. R20). Estos resultados indican que tanto la boldina como el mexiletine producen un bloqueo parcial de I_{Na} , siendo el bloqueo observado a altas concentraciones de boldina mayor que el bloqueo producido por el mexiletine a la misma concentración.

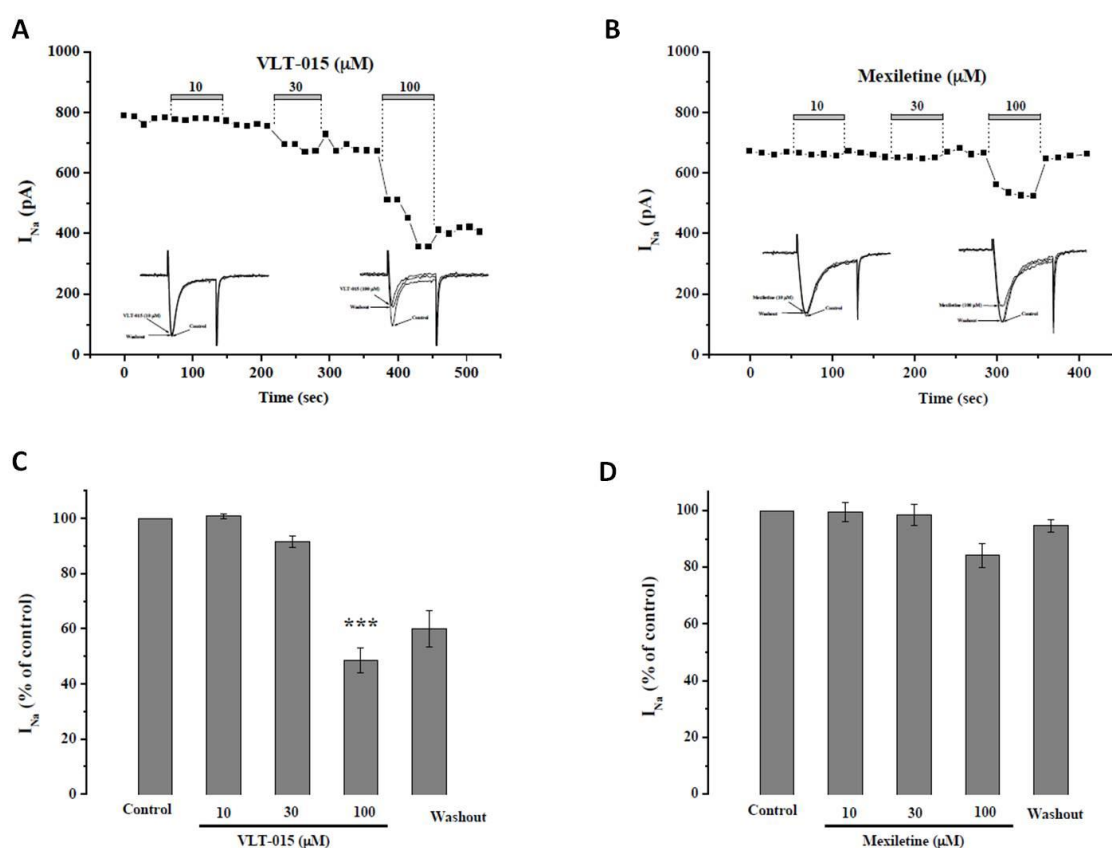


Figura R20. Bloqueo provocado por la boldina y el mexiletine de las corrientes de entrada a la célula a través de canales de sodio (I_{Na}) voltaje dependientes en células cromafines bobinas. Para las mediciones de I_{Na} , el potencial de membrana de las células se fijó en -80 mV. Se aplicó a las células un pulso *test* a 0 mV (10 ms de duración) cada 15 s. En la parte superior se muestra las curvas dosis respuesta de I_{Na} generadas por los pulsos secuenciales de 0 mV. La aplicación de la boldina (VLT-015)(A) y mexiletine (B) a 10, 30 y 100 μM se indica con las barras horizontales superiores. En la parte inferior se muestran las medidas normalizadas del bloqueo de I_{Na} provocado por la boldina (C) y mexiletine (D) respecto al control sin compuesto. Se analizaron datos de 8 células de 3 cultivos diferentes. *** $p < 0.005$ respecto al control. Ensayo calculado con el test t de student no pareado.

5.3.2 Efecto de la boldina y el mexiletine sobre corrientes de entrada a través de canales de calcio (Ca^{2+}) dependientes de voltaje

Para la determinación de los efectos de la boldina y el mexiletine sobre corrientes de entrada a través de canales Ca^{2+} voltaje dependientes, utilizamos tanto 10 mM de calcio (I_{Ca}) como 10mM de bario (I_{Ba}) como iones transportadores de carga.

Mediante la técnica de patch-clam convencional en la variante de célula entera en células cromafines bovinas, determinamos que la boldina, a las dos concentraciones testadas (10 μ M y 100 μ M) provoca un rápido bloqueo de I_{Ca} dependiente de dosis, observándose un bloqueo de I_{Ca} del 40% tras la perfusión de las células con boldina a 100 μ M (Fig.R21A). Aunque los resultados obtenidos para el mexiletine respecto al bloqueo de I_{Ca} fueron similares a los observados con la boldina, se observaron diferencias respecto a la cinética de inactivación asociada a dichos compuestos. Tras la exposición a boldina a 100 μ M, la inhibición de I_{Ca} observada al final del pulso fue mayor que la observada durante el pico del pulso eléctrico. Este efecto en la cinética de inactivación no se observó con el mexiletine (Fig.R21C).

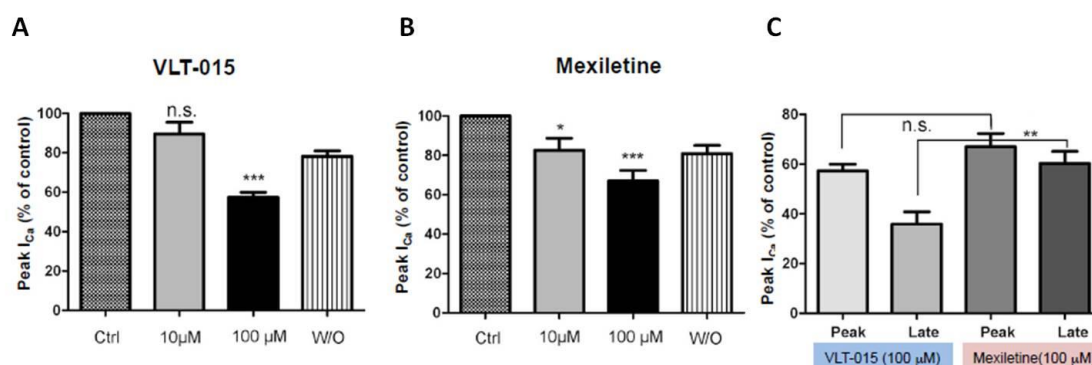


Figura R21. Bloqueo provocado por la boldina y el mexiletine de las corrientes de entrada a la célula a través de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (I_{Ca}) en células cromafines bobinas. Para las mediciones de I_{Ca} , el potencial de membrana de las células se fijó en -80 mV. Se aplicó a las células un pulso *test* a 0-+10 mV (50 ms de duración) cada 30 s. Como ion trasportador de carga se utilizó 10 mM Ca^{2+} . La boldina (VLT-015) (A) y el mexiletine (B) provocaron un bloqueo de I_{Ca} siendo mayor a 100 μ M. (C) Medidas normalizadas del bloqueo de I_{Ca} durante el pico y el final del pulso eléctrico provocadas por la boldina y el mexiletine. Se analizaron datos de 8 células de 3 cultivos diferentes. En todos los casos se muestra la media normalizada respecto al control sin compuesto. *** $p < 0.005$ respecto al control. Ensayo calculado con el test t de student no pareado

Posteriormente testamos el efecto de ambos compuestos en corrientes de entrada a través de canales Ca^{2+} dependientes de voltaje utilizando 10 mM de Ba (I_{Ba}) como ión transportador de carga. Tal y como sucedió en I_{Ca} , la boldina produjo un bloqueo de I_{Ba} rápido y dependiente de dosis a las dos concentraciones testadas, siendo el bloqueo del 27.3% a 10 μ M y del 37.3% a 100 μ M (Fig R22). El mexiletine, produjo un bloqueo de I_{Ba} similar al observado por la boldina. Así mismo, la boldina produjo efectos en la

cinética de inactivación de I_{Ba} similares a los anteriormente descritos, efectos no observados con el mexiletine.

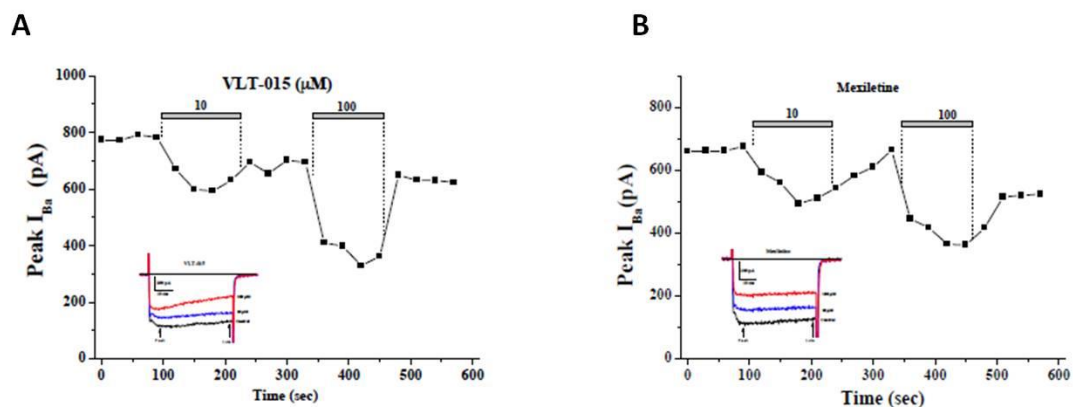


Figura R22. Bloqueo provocado por los compuestos boldina y mexiletine de I_{Ba} en células cromafines bobinas. Para las mediciones de I_{Ba} , el potencial de membrana de las células se fijó en -80 mV. Se aplicó a las células un pulso *test* a 0 - $+10$ mV (50 ms de duración) cada 30 s. Como ion transportador de carga se utilizó 10 mM Ba^{+2} . Curvas dosis respuesta de I_{Ba} generadas por los pulsos secuenciales de 0 mV. La aplicación de la boldina (VLT-015) (A) y mexiletine (B) a 10 μ M y 100 μ M se indica con las barras horizontales superiores.

5.3.3 Efecto de la boldina y el mexiletine sobre corrientes de salida a través de canales de potasio (K^+)

En las células cromafinas bobinas, como en la mayoría de las células, K^+ es ión responsable de la repolarización de la membrana. En estas células, las corrientes de salida de K^+ se asocian con dos tipos de canales; canales de K^+ dependientes de voltaje (I_{K-VD}), y canales de K^+ dependientes del ion calcio (I_{K-Ca}) (Marty *et al.*, 1985).

Llevamos a cabo estudios electrofisiológicos de I_{K-VD} e I_{K-Ca} mediante la técnica patch-clam convencional en la variante de célula entera en células cromafines bovinas. Tras la perfusión de las células con boldina y mexiletine a 10 μ M y 100 μ M, la boldina indujo una disminución de I_{K-Ca} no significativa, pero sí que se observó un bloqueo significativo de I_{K-VD} . El mexiletine indujo una reducción significativa de ambos canales (Fig. R23).

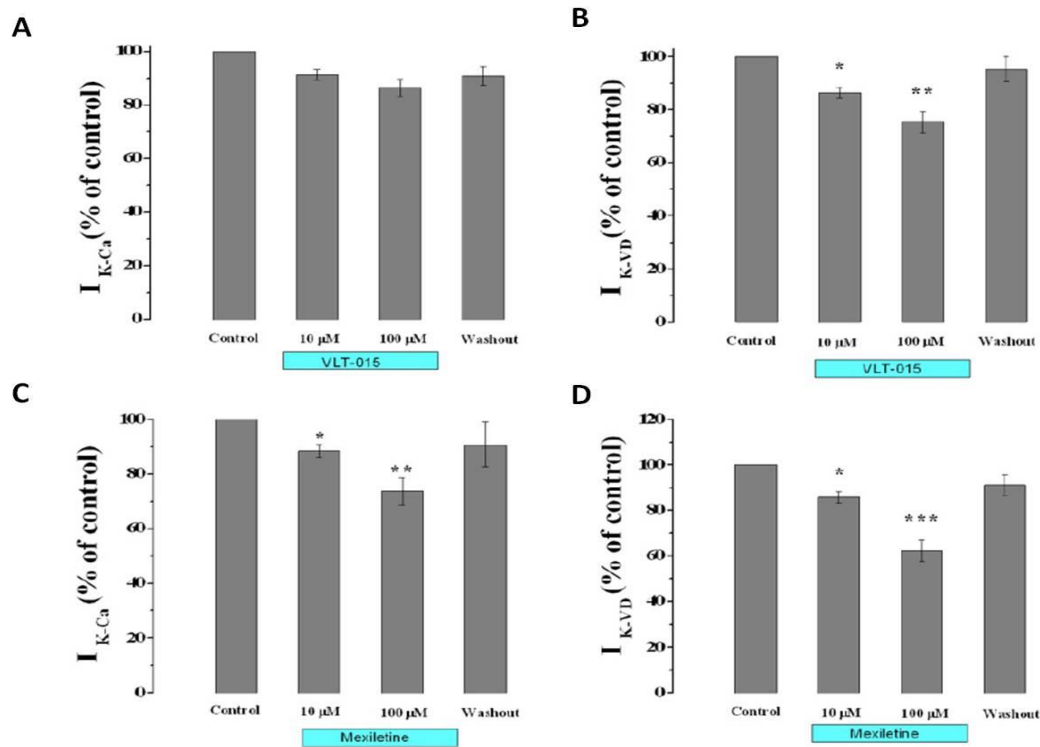


Figura R23. Bloqueo provocado por la boldina y el mexiletine de las corrientes de salida a través de canales K⁺ (I_K) en células cromafines bobinas. Ensayo de patch-clamp en la variante de célula completa. El potencial de membrana de las células se fijó en -80 mV. Se aplicó a las células un pulso despolarizante de 30 mV (10 ms de duración) (para facilitar la entrada de Ca⁺² y activar el I_{K-Ca}) seguido de un pulso de +120 mV (400 ms de duración) con un intervalo de 10 ms. I_{K-Ca} se midió como el pico de I_K obtenido al inicio del pulso de 400 ms e I_{K-VD} se midió como la corriente obtenida al final de dicho pulso despolarizante. En la parte superior de la figura se muestran la media normalizada del bloqueo provocado por la boldina (VLT-015) a diferentes concentraciones en I_{K-Ca} (A) e I_{K-VD} (B). En la parte inferior se muestra la media normalizada del bloqueo provocado por el mexiletine a diferentes concentraciones en I_{K-Ca} (C) e I_{K-VD} (D). Los datos muestran la media de las medidas de 8 células de 3 cultivos celulares diferentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ respecto al control sin compuesto.

5.3.4 Efecto de la boldina y el mexiletine en corrientes de entrada a través de receptores nicotínicos neurales

Para determinar si la boldina y el mexiletine afectaban a la actividad de receptores nicotínicos neurales (AChR), llevamos a cabo estudios electrofisiológicos de las corrientes de entrada a través de receptores AChR (I_{ACh}) mediante la técnica patch-clamp convencional en la variante de célula entera en células cromafines bobinas. Tanto la boldina como el mexiletine provocaron un bloqueo de I_{ACh} dependiente de dosis a las dos concentraciones testadas (10 µM u 100 µM) (Fig. R24).

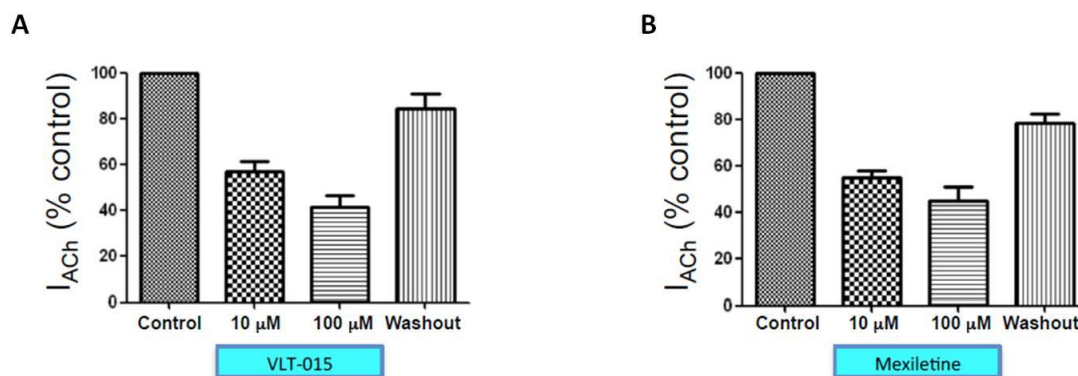


Figura R24. Bloqueo provocado por la boldina y el mexiletine de las corrientes de entrada a través de receptores nicotínicos neurales (I_{ACh}) en células cromafines bobinas. Para las mediciones de I_{ACh} , el potencial de membrana de las células se fijó en -80 mV. Se aplicó a las células un pulso de 500 ms con una solución de $100 \mu\text{M}$ de ACh en intervalos de 1 minuto. Se muestran los datos del bloqueo provocado por la boldina (VLT-015) (A) y el mexiletine (B) a las concentraciones de $10 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$ normalizados respecto al control sin compuesto. Datos obtenidos de la media de las medidas de 6 células provenientes de 3 cultivos celulares diferentes.

Los datos obtenidos muestran que la boldina tiene un potencial de acción de amplio espectro sobre el bloqueo de diferentes canales iónicos similar al provocado por el mexiletine. Dado el mecanismo de acción independiente a las repeticiones tóxicas supuesto para la boldina, la actividad antimiotónica de este compuesto podría estar relacionada con su capacidad para la interacción con los canales iónicos.

6. Estudios de seguridad farmacológica de la boldina

Una vez determinados los datos relativos a la actividad bioquímica *in vitro* y a la eficacia *in vivo* de la boldina, siguiendo con el último objetivo de este trabajo y con el fin de evaluar su potencial como posible fármaco, llevamos a cabo diferentes estudios relativos al perfil de seguridad farmacológica de este compuesto. La seguridad farmacológica evalúa los potenciales efectos adversos que un candidato pueda tener sobre los sistemas fisiológicos principales del cuerpo tales como el sistema nervioso central, el sistema respiratorio o el sistema cardiovascular, además de determinar todos los datos relativos a la dosis del candidato (Curtis *et al.*, 2008).

6.1 Estudios de seguridad cardíaca

Tal y como se describe en los resultados expuestos, la boldina influye en el flujo intracelular de diferentes iones a través de canales de membrana. Los resultados anteriormente descritos nos condujeron al estudio de la interacción de la boldina con canales iónicos que son fundamentales en la función cardíaca, ya que está bien

documentado que la interacción de fármacos con estos canales puede tener efectos secundarios no deseables y llevar al fracaso a tales fármacos en la fases clínicas de desarrollo. Para determinar el potencial de la boldina para interferir con la función cardiaca, el colaboración con la Fundación MEDINA, se estudiaron tres tipos de canales iónicos esenciales para dicha función, el canal de potasio hERG (corriente rápida de repolarización IKr), el canal de sodio Nav1.5 (corriente de despolarización INa), y el canal de calcio de tipo L Cav1.2 (corriente de repolarización ICa).

6.1.1 Efecto de la boldina sobre el canal de sodio Nav1.5

El canal de sodio Nav1.5 está involucrado en la fase 0 del potencial de acción, siendo el responsable de la despolarización del músculo cardiaco, iniciando dicho potencial. Debido al importante papel que juega este canal en el potencial de acción, se ha propuesto que anomalías en la cinética de apertura y cierre de estos canales pueden jugar un papel muy importante en la seguridad de compuestos identificados como candidatos a futuros fármacos (Liu *et al.* 2005).

Para el estudio de este canal utilizamos un ensayo funcional basado en la técnica de FRET (Huang *et al.* 2006), con células HEK293 que expresan de forma estable el canal Nav1.5. La boldina fue testada a 12.5 μM y 50 μM provocando un porcentaje de inhibición de Nav1.5 del 2% y del 10% respectivamente.

Los resultados mostraron que a la máxima concentración testada, la boldina no tiene actividad sobre este canal.

6.1.2 Efecto de la boldina sobre el canal de calcio Cav1.2

El canal de calcio tipo L es el responsable de la iniciación del latido del corazón, de la conducción del potencial de acción a lo largo del nodo auriculoventricular, de la duración de la fase de meseta del potencial de acción y de la regulación de la contractibilidad de los cardiomiocitos. Cualquier fármaco que modifique el comportamiento de estos canales podrá tener un impacto significativo en la función cardiaca. Para el estudio de la influencia de la boldina en el canal de calcio Cav1.2, utilizamos un ensayo funcional basado en una sonda fluorescente sensible a la concentración de iones Ca^{2+} (Fluo-4-AM). Como modelo se utilizaron células HEK294 que expresan de forma estable el canal de calcio Cav1.2. El ensayo se realizó en dos condiciones de potencial de membrana. En condiciones del canal CAV1.2 despolarizado la CI_{50} de la boldina fue superior a 50 μM . Teniendo en cuenta que la CI_{50} del control positivo Isradipine es menor de 10 μM , podemos determinar que en esta condición la boldina no tiene actividad sobre el canal.

Seguidamente, calculamos el porcentaje de inhibición de Cav1.2 con un potencial de membrana en condiciones de reposo. La boldina fue testada a 12,5 μM y 50 μM provocando un porcentaje de inhibición de Cav1.2 del 3% y del 9.5% respectivamente, lo que indica que la boldina tampoco tiene actividad sobre este canal en condiciones de reposo.

6.1.3 Efecto de la boldina sobre el canal de potasio hERG

El gen hERG (human ether-à-go-go-related gene) se expresa de forma abundante en tejido cardiaco (Sanguinetti *et al.* 2005). Mutaciones en este gen están asociadas al genotipo 2 del síndrome del QT largo, considerado como factor de riesgo que predispone a muerte súbita por arritmias ventriculares.

Para el estudio de este canal utilizamos un ensayo funcional basado en la utilización de la sonda fluorescente (FluxOR™, Invitrogen) que emite fluorescencia tras su unión a iones talio (Beacham *et al.* 2010), en células HEK293 que expresan de forma estable el canal hERG. A partir de la curva de concentración-respuesta de inhibición de hERG de la boldina, se determinó la CI_{50} en 18,76 μM . Dado que la CI_{50} obtenida fue mayor de 10 μM , consideramos una baja actividad de la boldina sobre este canal.

6.3 Determinación de la dosis tóxica de la boldina

A fin de determinar si la boldina es tóxica a concentraciones a las cuales resulta eficaz en los diferentes modelos de DM1 llevamos a cabo estudios de toxicidad en células provenientes de pacientes y en ratones HSA^{LR}

6.3.1 La boldina no resulta tóxica a concentraciones a las que es eficaz en células DM1

Según los datos expuestos en el apartado 3.1 de este capítulo, la boldina disminuyó la formación de *foci* ribonucleares en células de pacientes a una concentración de 100 μM . A fin de determinar si esta dosis activa se encontraba lejos del umbral de dosis tóxica, calculamos la dosis letal 50 (DL_{50} , o dosis a la que muere el 50% de la población), y la dosis letal 10 (DL_{10} , o dosis a la que muere el 10% de la población) de la boldina.

Para la terminación de la citotoxicidad asociada a la boldina, utilizamos un ensayo de viabilidad celular (CellTiter, Promega) en el que se relaciona la medida de luminiscencia obtenida con el número de células metabólicamente activas. Fibroblastos derivados de pacientes portadores de 333 repeticiones CTG fueron incubados con diferentes concentraciones de boldina. Transcurridas 72 h desde la adición de diferentes concentraciones de boldina, se obtuvieron los datos del número

de células viables. Se determinó la DL_{50} y la DL_{10} de la boldina en $822 \mu\text{M}$ y $441 \mu\text{M}$ respectivamente (Fig.R25) lo que indica que la dosis tóxica de este compuesto en células DM1 está muy alejada de la dosis a la que muestra actividad.

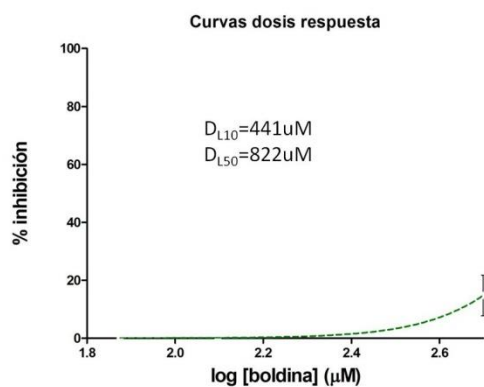


Figura R25. DL_{50} y DL_{10} de la boldina en fibroblastos de pacientes portadores de 333 repeticiones CTG. Fibroblastos derivados de pacientes portadores de 333 repeticiones CTG fueron incubados con diferentes concentraciones de boldina. Trascurridos tres días de incubación, se cuantificó el número de células viables con el kit colorimétrico Celltiter (Promega). Se muestra el % de inhibición del número de células vivas a diferentes concentraciones de boldina. DL_{50} y DL_{10} calculadas con el programa GraphPad.

6.3.2. Determinación de la toxicidad *in vivo* de la boldina

Con el fin de estudiar el posible efecto tóxico de la boldina en mamíferos diseñamos un protocolo en el que ensayamos diferentes dosis de boldina administrada por las vías intramuscular, intraperitoneal e intragástrica en ratones modelo de DM1 HSA^{LR}. Para cada concentración se trataron un número de entre 3 y 6 ratones. Los animales fueron tratados con una inyección diaria durante 3 días en el caso de las vías de administración intramuscular e intraperitoneal y de 5 días en el caso de la ruta intragástrica. Diariamente se llevó a cabo un examen visual de los diferentes animales incluidos en el estudio anotando cualquier anomalía observada (Tabla R1). Los datos obtenidos en el ensayo sirvieron para determinar las concentraciones a las que testar la eficacia de la boldina en el ratón HSA^{LR} descritas en el apartado 4 de este capítulo.

Cabe remarcar que tras la administración intramuscular, ninguna de las dosis testadas fue letal. Teniendo en cuenta que la boldina resultó activa respecto a la reducción de miotonía a una dosis de 25 mg/kg , podemos concluir que la boldina no es tóxica a concentraciones las cuales resulta eficaz en ratones modelo de DM1.

Ratón	Ruta	Dosis (mg/kg)	Tratamiento	Toxicidad
HSA^{LR}	Intramuscular	60	1 inyección/día	60 mg/kg, posición de lomo encorvado (asociado con dolor) tras la primera dosis. Dosis no letales al final del tratamiento.
		50	3 días	
		25		
		12.5		
HSA^{LR}	Intraperitoneal	150	1 inyección/día	150 mg/kg, letal tras la primera dosis.
		60	3 días	60 mg/kg, convulsiones tras la primera dosis.
		30		30 mg/kg posición de lomo encorvado tras la primera inyección.
HSA^{LR}	Intragástrica	100	1 inyección/día	100 mg/kg, letal al final del tratamiento.
		50	5 días	50 mg/kg, 60% de letalidad al final del tratamiento.
		25		25 mg/kg. No toxicidad al final del tratamiento.

Tabla R1. Toxicidad aguda de la boldina en diferentes vías de administración en ratones HSA^{LR}.

7. Propiedades farmacocinéticas de la boldina

La farmacocinética es la rama de la Farmacología que se ocupa de aquellos procesos a los que se someterá un fármaco durante su paso por el organismo, desde que es administrado por primera vez, hasta su total eliminación del cuerpo. Los sucesivos pasos que atraviesa el fármaco en el organismo, se agrupan con el acrónimo LADME: liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción (Balani *et al.*, 2005). Dada la importancia del conocimiento de las propiedades LADME de un compuesto, llevamos a cabo una serie de experimentos destinados a conocer datos relativos a la distribución y el metabolismo de la boldina.

7.1 Estudios de absorción de la boldina, ensayo de absorción *in vitro*

El desarrollo de moléculas candidatas a fármacos requiere la realización de estudios predictivos de su absorción oral. En este sentido, la permeabilidad de los compuestos candidatos a través de la membrana intestinal es un parámetro clave, directamente relacionado con el proceso de absorción oral. En colaboración con el laboratorio CEREP, llevamos a cabo un estudio de absorción *in vitro* de la boldina en un modelo de epitelio intestinal basado en células monocapa Caco-2.

En un estudio de permeabilidad A-B determinamos el Coeficiente de Permeabilidad Aparente (Papp) de la boldina, parámetro que relaciona el proceso de permeabilidad con el paso a través de la superficie intestinal (Arturson *et al.*, 1991). El Papp se calculó a partir de la medida de la concentración de compuesto que circula en las direcciones apical (A) y basolateral (B) a través de una monocapa celular. Con el fin de validar la

robustez del ensayo, además de la boldina, se utilizaron diferentes compuestos de referencia con un Papp conocido, y con diferente rango de permeabilidad.

Los compuestos se testaron a una concentración de 10 μM y 1% de DMSO. Tras una incubación a 37°C, la cantidad de compuesto a cada lado de la monocapa se determinó por HPLC. Para cada uno de los compuestos se llevaron a cabo dos mediciones.

La boldina mostró un Coeficiente de Permeabilidad Aparente en sentido A-B (apical-basolateral) mayor que en sentido contrario ya que el Paap A-B fue de 53×10^{-6} cm/s mientras que el B-A fue de 26.7×10^{-6} cm/s (Tabla R2). Además, en comparación con los compuestos de referencia, la boldina obtuvo un perfil de permeabilidad similar al del propranolol, compuesto altamente permeable con un 90% de absorción en humanos. Teniendo en cuenta el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, un compuesto con un Paap superior a 20×10^{-6} cm se denomina muy permeable considerándose un compuesto sin limitaciones debidas a la permeabilidad (Van de Waterbeemd, 1998), por ello podemos concluir que la boldina es un compuesto altamente permeable según un modelo de epitelio intestinal *in vitro*.

Compuesto	Permeabilidad A-B (Paap, 10^{-6}cm/s)			Permeabilidad B-A (Paap, 10^{-6}cm/s)		
	Medida 1	Medida 2	Media	Medida 1	Medida 2	Media
Boldina	52.87	53.18	53.0	28.32	25.12	26.7
Propranolol	84.31	70.43	77.4	22.22	21.84	21.5
Labetalol	17.92	16.40	17.2	43.14	43.62	43.4
Ranitidina	0.95	1.09	1.0	2.47	2.43	2.4
Colchicina	0.20	0.14	0.2	13.30	11.40	12.4

Tabla R2. Coeficiente de Permeabilidad Aparente en las direcciones A-B y B-A de la boldina así como de los compuestos de referencia propranolol, labetalol, ranitidina y colchicina.

7.2 Distribución de la boldina, determinación de los niveles plasmáticos y tisulares de la boldina en ratón

Un aspecto crítico para que una molécula se considere apta para su posterior desarrollo farmacológico es que tenga una distribución óptima. La distribución de un compuesto puede definirse como la llegada y disposición de dicha molécula a los diferentes tejidos del organismo. Dado que cada tejido puede recibir cantidades diferentes del compuesto, el cual puede pasar allí tiempos variables, en colaboración

con el Dr. Jose Esteban Peris del Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia decidimos abordar un estudio destinado a determinar los niveles plasmáticos y tisulares de la boldina en ratón.

Aunque los problemas musculares son altamente invalidantes en pacientes, no hay que menospreciar los problemas cognitivos (Peric *et al.*, 2014), por ello, además de determinar los niveles de boldina presentes en el torrente sanguíneo, analizamos la cantidad de compuesto presente en dos de los tejidos diana; el músculo y el cerebro.

Para el ensayo de distribución se emplearon ratones macho CD-1. A cada animal se le administró una dosis de 0.5 mg del producto (aproximadamente 20 mg/kg) por vía intravenosa. Se determinó la concentración de boldina en muestras de plasma y tejido a diferentes tiempos de muestreo. La determinación de la concentración de la boldina en las diferentes muestras se efectuó mediante cromatografía líquido-líquido de alta eficacia (HPLC) con detección fluorimétrica. Para cada tiempo de muestreo se emplearon 3 ratones.

Tras una única inyección intravenosa en ratón, fuimos capaces de detectar boldina tanto en plasma como en músculo y cerebro, lo que indica que la boldina se distribuye a través del torrente sanguíneo cruzando la barrera hematoencefálica (Tabla R3).

Tiempo (Min)	Cplasma mcg/ml	Ccerebro mcg/ml	Cmúsculo mcg/ml	Ratio Cm/Cp	Ratio Cc/Cp
5	2.67±1.17	5.61±2.30	4.93±1.29	2.13±0.15	2.01±0.54
10	1.81±0.47	3.85±1.09	3.28±0.80	2.12±0.06	1.85±0.35
20	0.65±0.02	1.22±0.15	1.13±0.27	1.88±0.19	1.74±0.38
30	0.13±0.03	0.22±0.05	0.23±0.03	1.79±0.21	1.83±0.23
45	0.07±0.05	0.12±0.07	0.09±0.05	2.03±0.32	1.37±0.37

Tabla 3. Concentración de boldina en plasma y tejidos de ratón a diferentes tiempos de muestreo tras una administración intravenosa. En cada tiempo se muestra la media y la desviación estándar de los datos obtenidos a partir de tres animales. Además de los microgramos/ mililitro (mcg/ml) de boldina identificados en plasma, cerebro y músculo, se muestra el ratio entre las concentraciones de boldina en músculo y plasma (Cm/Cp), y en cerebro y plasma (Cc/Cp)

Según los datos de distribución obtenidos, la boldina es absorbida de forma rápida con una concentración máxima en plasma, músculo y cerebro alcanzada durante los 5 primeros minutos tras la inyección.

La concentración máxima de boldina se encontró en el cerebro, siendo esta ligeramente superior a la concentración de boldina en músculo. Así mismo, la concentración tisular de la boldina fue superior a la plasmática en todos los puntos de muestreo, llegándose a detectar el doble de boldina en músculo y cerebro frente al

plasma. Así mismo, cabe destacar que la cinética del proceso de absorción y eliminación de la boldina es similar tanto en plasma como en los tejidos analizados.

Tras una absorción rápida, la boldina parece tener una vida media corta dado que a los 30 minutos tras la inyección, la concentración de boldina en plasma y tejidos fue cercana a cero (Fig. R26). El hecho de que la vida media de la boldina sea tan corta, pone de manifiesto que la distribución de este compuesto pueda no ser la óptima como para su posterior desarrollo farmacológico. A este respecto sería interesante buscar compuestos derivados de la boldina, con una actividad terapéutica al menos similar, pero con aumento en la vida media.

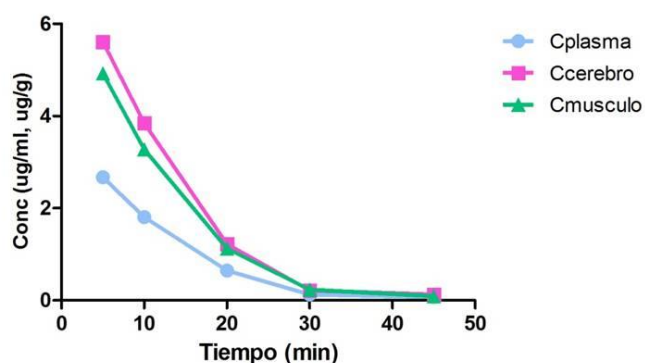


Figura R26. Cinética de la concentración de boldina en plasma, cerebro y músculo tras la inyección intravenosa en ratón. En cada tiempo se muestra la media de los datos obtenidos a partir de tres animales.

7.3 Metabolismo de la boldina, ensayo de inhibición de citocromo P450

Los citocromos P450 (CYP) constituyen una superfamilia de isoformas que desempeñan un papel importante en el metabolismo de fármacos. Cada isoforma posee un amplio espectro de sustratos sobre los que puede actuar, lo cual explica el elevado número de interacciones farmacológicas por inhibición de CYP en personas tratadas con varios fármacos. Además, pueden producirse interacciones entre fármacos como resultado de la inducción de varios CYP tras de un tratamiento farmacológico prolongado (Lin JH y Lu YH, 1998).

Dada la importancia de este parámetro, en colaboración con la Fundación MEDINA, determinamos el perfil de inhibición de citocromo P450 de la boldina.

Uno de los modelos más ampliamente utilizados para el estudio *in vitro* de la inhibición CYP, son los microsomas hepáticos humanos. Utilizando este modelo celular y mediante cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas, cuantificamos la actividad de la enzima en presencia de boldina y de ketocomazole, compuesto utilizado como control con un perfil de inhibición conocido. Ambos compuestos fueron disueltos a una concentración de 25 mM en DMSO a partir de la que se hicieron diluciones seriadas obteniendo 10 concentraciones diferentes de cada compuesto.

Tras la incubación de los microsomas hepáticos con las diferentes concentraciones de cada compuesto se midió la actividad del citocromo CYP3A4. Los resultados obtenidos mostraron una IC₅₀ del Ketocomazol de 0.05 μ M, tal y como está descrito en la literatura. La IC₅₀ observada para la boldina fue de 80.5 μ M (Fig. R27).

Según los criterios generales de clasificación se considera que un compuestos con una IC₅₀>10 μ M es un inhibidor de CYP débil, por lo que se espera que la boldina no presente interacciones con el citocromo CYP3A4.

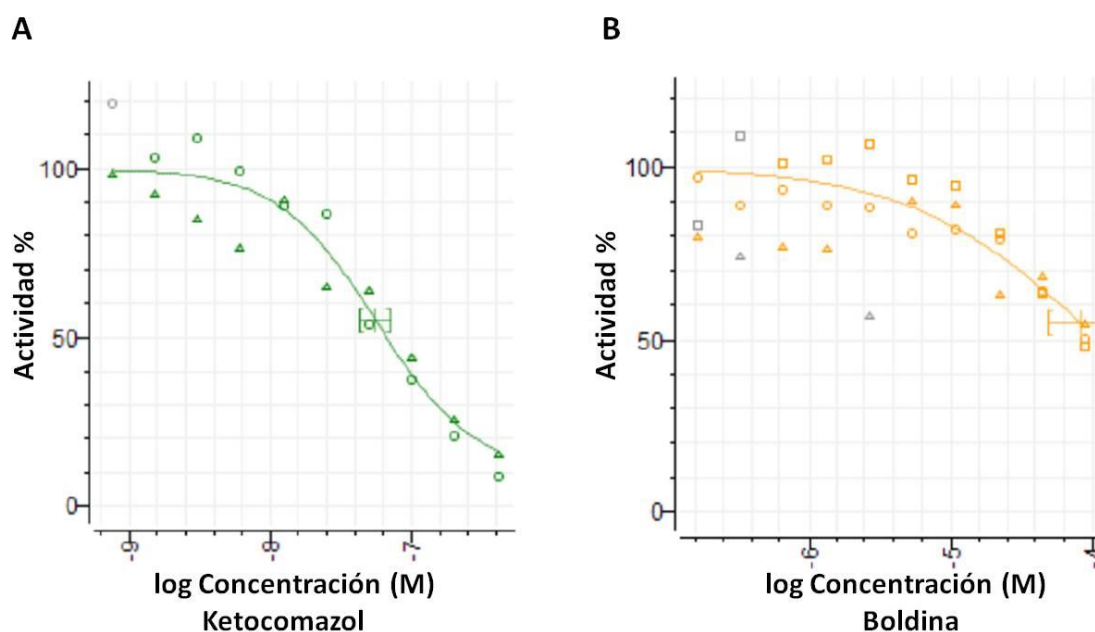


Figura R27. Curva dosis respuesta de la inhibición de CYP3A4. Microsomas hepáticos humanos fueron incubados con diferentes concentraciones del compuesto inhibidor control Ketocomazol (A) y de boldina (B). La actividad del CYP3A4 se determinó mediante cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas.

8. Estudio de la eficacia in vivo de moléculas análogas a la boldina

Tras determinar el potencial anti DM1 de la boldina nos propusimos el estudio de moléculas con una estructura química similar con el objetivo de identificar análogos a la boldina con actividad antimiotónica a nivel sistémico. Para ello, como una primera aproximación seleccionamos compuestos disponibles comercialmente y testamos su actividad antimiotónica en el ratón HSA^{LR}. Una vez identificados 4 derivados (Fig. R28), los compuestos fueron administrados por vía intraperitoneal a 50 mg/Kg (n=3) (dosis sub tóxica para todos los compuestos). Tras una única aplicación, la mionía fue medida trascurridas 1, 3 y 24 horas. Ninguno de los compuestos testados redujo los niveles de mionía en los puntos testados quedando destartado así su pontencial antimiotónico

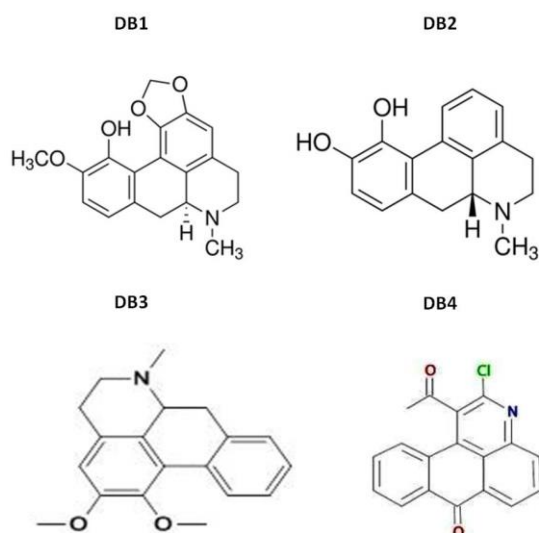


Figura R28. Derivados estructurales de la boldina. Estructura química de los cuatro compuestos seleccionados por su analogía estructural a la boldina y su disponibilidad a nivel comercial.

Los datos de eficacia *in vivo* obtenidos con estos cuatro compuestos análogos sugieren que de cara al diseño e identificación de moléculas derivadas de la boldina con actividad a nivel sistémico, será necesario un estudio más amplio en el que se incluya un número mayor tanto de moléculas como de modificaciones estructurales.

Discusión

Discusión

1. La boldina mejora un fenotipo DM1 en moscas *spliceosensoras*

El punto de partida de este trabajo, son los resultados obtenidos tras un rastreo de *in vivo* de más de 15.000 moléculas químicas diferentes llevado a cabo en nuestro laboratorio mediante el uso de moscas DM1 *spliceosensoras*. Estas moscas transgénicas expresan el minigen humano del receptor de la insulina (INSR) fusionado al gen reportero luciferasa, de forma que cambios en el *splicing* del minigen provocan cambios en los niveles de expresión del reportero. Tras clasificar los compuestos incluidos en el rastreo por el valor de su Z-score, seleccionamos como positivos aquellos compuestos capaces de aumentar los niveles de luciferasa por encima de 3 desviaciones típicas, es decir con un Z-score de 3 o superior. Así, identificamos 126 compuestos como positivos primarios. Cabe destacar que la boldina, molécula sobre la que se centra el presente trabajo, no se incluyó inicialmente en el grupo de compuestos activos.

Sin profundizar en el diseño racional del rastreo de compuestos anteriormente citado, es remarcable citar que el uso de moscas *spliceosensoras* ofrece la posibilidad de identificar moléculas activas por diferentes mecanismos, ya que el fenómeno modelizado abarca una aproximación basada en un fenotipo ligado a una alteración en el *splicing* inducida por las repeticiones CUG, sin conectar la actividad del compuesto evaluado con un mecanismo de acción específico. Respecto al hecho de que se tomara un proceso de *splicing* alternativo como diana del ensayo, es remarcable que aunque se han descrito algunas diferencias a nivel de *splicing* alternativo entre *Drosophila* y mamíferos (Mount *et al.*, 1992; Irion, 2012), existe una gran conservación entre los mismos (Venables *et al.*, 2012). Además, el hecho de que este rastreo haya identificado compuestos que se han confirmado como activos en ensayos secundarios, muestra que, en las condiciones específicas del ensayo, las diferencias en la maquinaria del *splicing* de las moscas *spliceosensoras* no son significativas, por lo que estas moscas reflejan lo ocurrido en DM1 en condiciones humanas.

El cabeza de serie de los compuestos seleccionados en el rastreo primario fue la estefenantrina, un fenantreno de origen natural y estructura conocida cuya actividad anti-DM1 parece estar relacionada con un mecanismo de acción aguas arriba de la ruta patológica descrita en DM1: la unión de forma específica a la horquilla tóxica formada por las repeticiones. Esta molécula reduce los *foci* ribonucleares y mejora el *splicing* de diferentes transcritos en células de pacientes. Además, mejora un aspecto funcional de la enfermedad como es la miotonía en ratones modelo DM1 de forma dependiente de dosis tras su administración intramuscular (manuscrito en preparación).

En el diseño tradicional de fármacos, una vez encontrado y definido el cabeza de serie, el siguiente paso es el estudio de su estructura con el fin de encontrar el conjunto de grupos relevantes de la molécula que interactúan con el receptor y que se pueden considerar responsables de su actividad biológica. Para ello, una primera aproximación se basa en la determinación de la actividad de diferentes compuestos análogos, lo que permite a su vez extraer conclusiones sobre las relaciones entre la estructura y la actividad biológica de una serie de compuestos parecidos en estructura química (Galbis, 2004).

De cara a la selección de moléculas análogas a la estefenantrina, un primer paso lógico y que nos permitía aprovechar los resultados que ya teníamos, fue la búsqueda de compuestos con una estructura similar dentro de las más de 15.000 moléculas incluidas en el rastreo primario. Estas moléculas, procedentes de diferentes librerías químicas y con orígenes diversos, suponían una gran fuente de diversidad química en la que buscar análogos además de tener un peso molecular pequeño, óptimo para su posterior desarrollo farmacológico. Así en un segundo análisis de los resultados obtenidos en el rastreo primario buscamos moléculas análogas a la estefenantrina identificamos la boldina, una molécula con un valor de Z-score en el rastreo primario muy cercano al umbral marcado para la determinación de compuestos positivos. A fin de descartar que la boldina pudiera ser un falso positivo, siguiendo el protocolo establecido para los 126 compuestos identificados como activos, la actividad de la boldina observada en el rastreo primario así como la de otros 32 compuestos, quedó validada en diferentes ensayos *spliceosensores* independientes. Este hecho, evidenció el potencial del rastreo de compuestos en moscas *spliceosensoras* para la identificación de compuestos similares con una misma actividad, y nos llevó a abrir una nueva línea de trabajo enfocada en la caracterización y validación de la actividad anti DM1 de la boldina.

Lo siguiente a confirmar, fue que los resultados obtenidos no eran debidos a una acción inespecífica del compuesto alterando los niveles de (CUG)₄₈₀ al interferir con la síntesis del factor Gal4 y/o con su unión a la secuencia reguladora UAS, disminuyendo así la expresión del transgén. El análisis del efecto de la boldina sobre los transgenes UAS-CTG₄₈₀ y UAS-*INSR*:Luc de forma independiente nos permitió comprobar que en efecto, los resultados obtenidos en el rastreo primario eran debidos a un efecto de la boldina sobre el *splicing* del minigén del receptor de la insulina en presencia de las repeticiones CTG. Así mismo, nos planteamos que la actividad de la boldina observada también podría ser debida a una reducción de la tasa de transcripción global si su acción afectase de alguna manera a componentes específicos de la maquinaria de transcripción/traducción. Este tipo de efecto inespecífico es el producido por los inhibidores de las proteínas Histona Deacetilasas (HDAC), los cuales reducen la tasa de transcripción celular y han mostrado ser eficaces en modelos de Huntington en *Drosophila* y Ratón (Marsh y Thompson, 2004). Sin embargo, la boldina no disminuyó

la actividad de la proteína reportera luciferasa expresada en la musculatura (*MHC-Gal4>UAS-Luc*), lo que descarta tanto un efecto del compuesto sobre la transcripción total o específica del sistema UAS/Gal4, como una acción de la boldina sobre la estabilidad o actividad de la luciferasa.

De este modo, tras distintos ensayos que descartaron cualquier tipo de falso positivo durante el proceso de *screening* primario, la actividad de la boldina quedó validada.

2. El tratamiento con boldina revierte fenotipos moleculares alterados en DM1 tales como la formación de *foci* ribonucleares

A pesar de la gran variedad de síntomas observados en pacientes, una de las características común a todos los enfermos de DM1 es la presencia de *foci* ribonucleares (Udd y Krahe, 2012). Estos agregados nucleares están formados por RNA de doble cadena y diferentes proteínas nucleares, y son característicos de aquellas enfermedades causadas por RNAs tóxicos (Caillet-Boudin *et al.*, 2014). En DM1, la formación de *foci* está presente en la mayoría de modelos entre los que se encuentran las moscas que expresan 480 repeticiones CTG en los músculos indirectos del vuelo (García-López *et al.*, 2008).

Dado que la estefenantrina redujo la formación de *foci* en estas moscas modelo de DM1, era de esperar que la boldina, una molécula de estructura similar mostrara el mismo comportamiento. Esta hipótesis quedó avalada por la significativa reducción del número de *foci* presentes en los músculos indirectos del vuelo, provocada por el tratamiento con boldina.

En los últimos años, el papel de los *foci* en el mecanismo de patogénesis de la DM1 ha suscitado una gran controversia. Los primeros trabajos sobre las bases moleculares de la DM1 mostraron la colocalización de las proteínas MBNL con los *foci* ribonucleares (Fardaei *et al.*, 2002) sin determinar que la formación de *foci*, por sí misma, sea necesaria para que se den las alteraciones en el *splicing* observadas en DM1. Además, ratones *knockout* para *Mbnl1* presentan fenotipos DM1 en ausencia de *foci* (Mahadevan *et al.*, 2006) y por el contrario, hay modelos en *Drosophila* donde a pesar de existir *foci*, no se observan fenotipos patogénicos (Housley *et al.*, 2005). Estos datos hacen que la patogenicidad de estos agregados resulte contradictoria, sin embargo, la presencia de los *foci* en pacientes de DM1 es un hecho, y la inhibición de la formación de *foci* ha sido un parámetro ampliamente utilizado en la validación de fármacos anti-DM1 (Wong *et al.*, 2014), e incluso se ha empleado como diana en rastreos de compuestos a gran escala (Ketlet *et al.*, 2014). En cualquier caso, La disminución observada en el número de *foci* en *Drosophila* tras el tratamiento con boldina indica

una interacción de esta molécula con las proteínas o RNAs implicados en la formación y mantenimiento de dichos agregados.

La capacidad de reducir la formación de *foci* ribonucleares observada para la boldina, no solo se limita a *Drosophila* si no que ha sido consistente en otros modelos DM1 tales como células derivadas de pacientes y ratones modelo de la enfermedad.

Para la validación de la boldina en modelos celulares utilizamos como herramienta fibroblastos y mioblastos derivados de pacientes. A pesar de existir varios modelos celulares de DM1, seleccionamos este tipo celular puesto que en los fibroblastos, al ser derivados de pacientes tenemos el contexto de la enfermedad al completo, lo que proporciona una mayor relevancia terapéutica permitiendo al mismo tiempo observar un amplio abanico de posibles mecanismos de acción de la boldina. El estudio de la formación de *foci* ribocleares en fibroblastos DM1 tras el tratamiento con boldina mostró una disminución significativa en el número de *foci* por célula así como un aumento del número de células sin *foci*. Ambos parámetros indican una mejoría en los fibroblastos de pacientes gracias a la acción de la boldina, lo que demuestra que este compuesto también es capaz de actuar en un contexto humano quedando descartado cualquier tipo de efecto específico de la boldina sobre *Drosophila*.

Finalmente, el último modelo de DM1 en el que estudiamos el potencial terapéutico de la boldina fue en ratones HSA^{LR}. Estos animales expresan 250 repeticiones CTG en un transcrito heterólogo y reproducen varios de los principales síntomas musculares de la DM1 (Mankodi *et al.*, 2000). No obstante, este modelo no desarrolla otros fenotipos como la atrofia muscular y en los últimos años, cada vez más investigadores encuentran una gran variabilidad en los fenotipos bioquímicos descritos en este modelo, especialmente a nivel del *splicing* e histología del tejido (datos no mostrados). Existen otros ratones DM1 entre los que se encuentra el DMSXL, denominado así por tener un número mayor de 1.300 repeticiones CTG que permanecen además en su contexto humano (45 kb de la región genómica que rodea a las repeticiones). Estos ratones reproducen aspectos de la enfermedad en diferentes tejidos, detectándose *foci* en músculo esquelético, corazón y sistema nervioso central, además de reproducir la inestabilidad somática e intergeneracional observada en pacientes (Huguet *et al.*, 2012). Sin embargo, este modelo cuenta con ciertas desventajas respecto al HSA^{LR} entre las que destaca una mayor complejidad a nivel de generación y mantenimiento, ya que para la obtención de ratones DMSXL homocigotos es necesario el cruce entre individuos de la misma cepa, teniendo este cruce una baja eficiencia. No obstante, dadas las diferencias entre ambos modelos, sería interesante estudiar la eficacia de la boldina en algunos de los fenotipos DM1 reproducidos por los ratones DMSXL tales como las alteraciones a nivel cardíaco y los problemas en el sistema nervioso central.

Los ratones HSA^{LR} se han utilizado tradicionalmente para la validación de compuestos anti DM1 permitiendo la identificación de compuestos capaces de revertir algunos de los fenotipos alterados tras su administración intramuscular (García-López *et al.*, 2011). Siguiendo este mismo planteamiento, decimos llevar a cabo la inyección intramuscular de boldina a las concentraciones de 25 mg/kg y 60 mg/kg en el músculo cuádriceps de la pata posterior izquierda y la correspondiente cantidad de DMSO en la extremidad posterior derecha. El análisis de criosecciones de dicho músculo procedentes de ratones HSA^{LR} tratados con boldina confirmó la actividad del compuesto sobre este modelo. En este caso, la boldina redujo la formación de *foci* disminuyendo el número de núcleos con *foci* presentes en las muestras. La reducción observada no parece ser dependiente de dosis puesto que se dio un porcentaje similar de núcleos con *foci* tras el tratamiento con ambas concentraciones. Por otra parte, descartamos un efecto a nivel sistémico de la boldina ya que las muestras procedentes de los cuádriceps derechos (tratados únicamente con DMSO) mostraron un número de *foci* similar al que se observa en los ratones HSA^{LR} de ese rango de edad. Estos datos confirman la actividad de este compuesto en mamíferos, lo que junto con su actividad en *Drosophila* y células derivadas de pacientes aumenta las posibilidades de que la boldina actúe sobre la formación de *foci* también en humanos.

3. La boldina reduce fenotipos funcionales de DM1

Otra característica reproducida por las moscas modelo de DM1 y común a los pacientes de esta enfermedad, es la reducción en la supervivencia (García-López *et al.*, 2008). De hecho en la actualidad diferentes estudios relacionan muchos de los síntomas de esta enfermedad con un proceso de envejecimiento prematuro. Los pacientes de DM1 experimentan un incremento en el riesgo de padecer neoplasias junto con una disfunción progresiva de múltiples órganos y tejidos entre los que se encuentran el músculo esquelético y cardíaco, el sistema endocrino, los ojos, las gónadas y el sistema nervioso central, lo que hace que en cierto modo la DM1 parezca un síndrome progeroide, definido como un proceso de envejecimiento acelerado con disfunción de diversos sistemas (Mateos-Aierdi *et al.*, 2015). En nuestro modelo de DM1 en mosca, en el que al igual de lo sucedido en pacientes se da una muerte prematura, el tratamiento continuado con boldina produjo una notable mejoría la supervivencia siendo este un fenotipo funcional alterado en DM1.

La boldina, también resultó activa en otro fenotipo a nivel funcional como es la miotonía observada en ratones modelo de la enfermedad. La miotonía o rigidez muscular específica tras una contracción voluntaria, es uno de los síntomas típicos de la DM1 y contribuye a la falta de destreza, problemas en la marcha, dificultad al hablar y tragar y al dolor muscular que sufren los pacientes de esta enfermedad (Logigian *et*

al., 2010). Los ratones HSA^{LR} presentan un grado de miotonía medible en cuádriceps que se mantiene constante a lo largo de la vida del ratón, sin presentar la variabilidad anteriormente descrita para otros fenotipos DM1. El tratamiento con boldina mediante inyección intramuscular redujo la miotonía de los ratones modelo de un modo dependiente de dosis, observándose una mayor disminución de la miotonía a las dosis más altas administradas (50 mg/kg).

Las alteraciones en el *splicing* del canal de cloro *CLCN1* se han considerado la causa de la miotonía presente en los pacientes. El *splicing* de *CLCN1* está mediado tanto por MBNL1 como por CELF1 y se ha postulado que las alteraciones en ambas proteínas provocan la disminución de *CLCN1* funcional, causando una reducción de la conductancia del cloro y una despolarización en los potenciales de membrana en las fibras musculares, lo que desencadena la miotonía característica de la DM1. Esta hipótesis viene abalada por los trabajos de Wheeler y colaboradores en los que diseñaron ASOs específicos para los transcritos *Clcn-1* en ratones HSA^{LR} observando una mejora de la miotonía (Wheeler, Lueck *et al.*, 2007). Aunque la miotonía presente en DM1 está principalmente asociada a una canalopatía del cloro, efectos en los canales de sodio y potasio también se han relacionado con esta alteración (Franke *et al.*, 1990; Behrens *et al.*, 1994). La miotonía podría contribuir a la generación de otros síntomas de la enfermedad puesto que además de las alteraciones en la homeostasis del calcio y de los defectos en el *splicing* de *SERCA*, parece posible que el exceso de calcio liberado durante las descargas miotónicas agrave la degeneración de las fibras musculares observado en pacientes DM1 (Wheeler, Lueck *et al.*, 2007).

El hecho de que el tratamiento con boldina en ratones HSA^{LR} no mejore las alteraciones en el *splicing* de diferentes transcritos, hace poco probable que la disminución en la miotonía de estos ratones sea debida a la actividad de la boldina sobre el *splicing* de *CLCN1*. Sin embargo, la boldina podría estar restaurando de forma indirecta los niveles de proteína *CLCN1* funcional. Sería interesante llevar a cabo estudios que permitieran la cuantificación de los niveles de proteína tras el tratamiento con boldina en ratones modelo. Más allá de su posible actividad sobre el canal de cloro, las interacciones de la boldina con diferentes canales de membrana sugieren que este compuesto podría estar actuando sobre canales iónicos implicados en el desencadenamiento de la miotonía.

A fin de cuantificar el potencial antimiotónico de la boldina, decidimos llevar a cabo un estudio comparativo frente al mexiletine, un antiarrítmico de clase Ib cuyo mecanismo de acción se basa en el bloqueo de canales de sodio. Aunque el mexiletine se ha considerado un antimiotónico efectivo en el tratamiento de la DM1 (Logigian *et al.*, 2010), algunos pacientes sufren efectos secundarios no deseados entre los que destacan los problemas cardíacos, mientras que otros no muestran ninguna mejoría. Por ello, la comunidad médica ha mostrado la necesidad de disponer de alternativas

frente a este antiarrítmico. En ratones HSA^{LR} tras la inyección intramuscular de boldina y mexiletine a la misma concentración, la reducción en la miotonía provocada por la boldina fue de mayor intensidad y duración que la asociada al tratamiento con el mexiletine. Sin embargo, en un modelo de miotonía inducida en ratón el mexiletine mostró una mayor actividad antimiotónica que la boldina tras la administración intragástrica de ambos compuestos.

En este modelo inducible, la miotonía es desencadenada en el ratón mediante una inyección intraperitoneal del compuesto 9-AC, el cual bloquea el canal de cloro CLCN1 en la musculatura esquelética (Desaphy *et al.*, 2013). Aunque existen modelos genéticos disponibles, para este ensayo preferimos el uso de un modelo farmacológico frente a un modelo genético ya que la inducción química no ofrece limitaciones en el número de animales disponibles, y además permite medir la miotonía de forma reproducible mediante un método no invasivo.

Cabe destacar que el modelo de miotonía inducible está considerado como un modelo de miotonía congénita, enfermedad incluida dentro de las miotonías no distróficas un grupo complejo de enfermedades que a diferencia de la Distrofia Miotónica no muestran destrucción muscular. Los cuadros mejor caracterizados son la miotonía congénita, la paramiotonía congénita, el síndrome de Schwartz-Jampel y la parálisis periódica hiperkalémica (Hoffman y Wang., 1993). La miotonía presente en el grupo de las miotonías no distróficas, está causada por alteraciones en los genes del canal de cloro *CLCN1* y del canal de sodio *SCN4A*, los cuales se expresan exclusivamente en la musculatura esquelética. La reducción en la actividad del canal de cloro y el incremento en la actividad del canal de sodio mutado desencadenan alteraciones en la transducción del impulso eléctrico, dificultando la relajación del músculo. La disminución de la miotonía provocada por una única dosis de boldina en el modelo de miotonía inducible nos indica que la boldina podría ser eficaz en el tratamiento de las miotonías no distróficas abriendo la puerta a nuevas líneas de investigación para este compuesto.

Las diferencias observadas respecto a la actividad de la boldina y mexiletine en los modelos murinos de DM1 y de miotonía inducible indican que el mecanismo de acción de ambos compuesto podría no ser idéntico siendo la actividad de la boldina más favorable en un contexto en el que se reproducen las diferentes alteraciones celulares características de la DM1.

4. La boldina actúa aguas abajo en el mecanismo de patogénesis de la DM1

Uno de los principales parámetros a la hora de dilucidar el mecanismo por el cual la boldina resulta activa en diferentes modelos DM1 fue determinar si existe una

interacción directa de este compuesto con las repeticiones CUG tóxicas. Dado que otros compuestos identificados mediante el modelo *spliceosensor* mostraron unirse a la horquilla de RNA formada por repeticiones tóxicas, nuestra primera hipótesis a validar fue determinar si la boldina tiene esta afinidad por el RNA. Además, estudios llevados a cabo con la boldina en el contexto de su unión al DNA han mostrado que aunque los alcaloides no son estructuras planas y no tienen la estructura típica de los intercaladores del DNA, la boldina se une de forma débil al DNA y puede considerarse un intercalador adaptativo, ya que se somete a un cambio conformacional hacia una estructura plana tras su unión al DNA (Hoet et al., 2004). Utilizando técnicas *in vitro* para el estudio de interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos, tales como ensayos de fluorescencia polarizada y retardo en gel, hemos podido comprobar que tal y como sugieren los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*, la boldina no se une al RNA tóxico, concluyendo que el mecanismo de acción de la boldina no está relacionado con una interacción directa del compuesto sobre las repeticiones CUG.

Además de los ensayos de unión, los resultados obtenidos respecto a la liberación de MBNL1 nuclear así como la medida de la mejora del *splicing* en diferentes modelos DM1 avalan la tesis de que la boldina actúa aguas abajo en el mecanismo de patogénesis de la enfermedad.

Teniendo en cuenta las bases moleculares de la DM1 y su asociación con el mecanismo de patogénesis de esta enfermedad, nuestra primera hipótesis fue pensar que una disminución del número de *foci* implicaría una mejora en la distribución de MBNL1 en el núcleo de la célula. Esta hipótesis vino reforzada por datos previos obtenidos en nuestro laboratorio para la estefenantrina, una molécula que en cultivo celular disminuye la formación de *foci* y mejora la distribución de MBNL1 (manuscrito en preparación). Además, vimos que existen otros ejemplos al respecto ya que diversos trabajos en los que se describen tanto pequeñas moléculas como oligonucleótidos antisentido con potencial anti-DM1, muestran este mismo comportamiento (Wong et al., 2014; Wheeler et al., 2012).

El tratamiento con boldina en mioblastos derivados de pacientes no modificó la distribución de MBNL1 en el núcleo celular, lo que resulta inconcluyente con su capacidad para reducir la formación de *foci* anteriormente descrita. Si tomamos la distribución de MBNL1 como una medida indirecta de la formación de *foci*, cabría pensar que el efecto de la boldina sobre la reducción de estos agregados en células humanas es específico de fibroblastos y no de mioblastos. Estudios recientes han descrito que los *foci* ribonucleares son estructuras dinámicas que se forman y disocian durante el ciclo celular (Querido et al., 2011; Xia y Ashizawa, 2015). De hecho, se ha descrito que el número de *foci* disminuye durante la mitosis celular, lo que podría explicar las diferencias observadas en la toxicidad de estos agregados en células proliferativas (Xia y Ashizawa, 2015). Cabría pensar que la disminución de *foci*

observada en fibroblastos podría ser debida a los cambios naturales en la dinámica de la formación de dichos agregados y no a un efecto específico de la boldina, sin embargo, el hecho de que el tratamiento con boldina reduzca la formación de *foci* en células musculares de *Drosophila* y ratón además de en fibroblastos, indica que la actividad de este compuesto sobre los *foci* es independiente de tipo celular.

Tal y como se ha descrito anteriormente, los *foci* ribonucleares son mucho más dinámicos de lo que se pensó en un principio. De hecho, varios investigadores han propuesto un modelo en el que las expansiones CUG pueden permanecer en forma de *foci* (forma insoluble) o en estado difuso (forma soluble), siendo esta homeostasis regulada por diferentes proteínas entre las que se encuentran las helicasas DDX5 y DDX6 (Pettersson *et al.*, 2015) (Fig. D1). Ensayos de unión *in vitro* han mostrado que DDX5 aumenta la capacidad de unión de MBNL1 a RNAs portadores de repeticiones CUG, GAG y CCUG sugiriendo así que DDX5 actúa como modulador en la unión de MBNL1 a las repeticiones tóxicas (Laurent *et al.*, 2012). De forma antagónica, la disminución de DDX6 en fibroblastos DM1 provoca un aumento en la intensidad y frecuencia de los *foci*, lo que sugiere que DDX6 podría modular la homeostasis de estos agregados en células DM1 favoreciendo el paso hacia una forma difusa (Pettersson *et al.*, 2014).

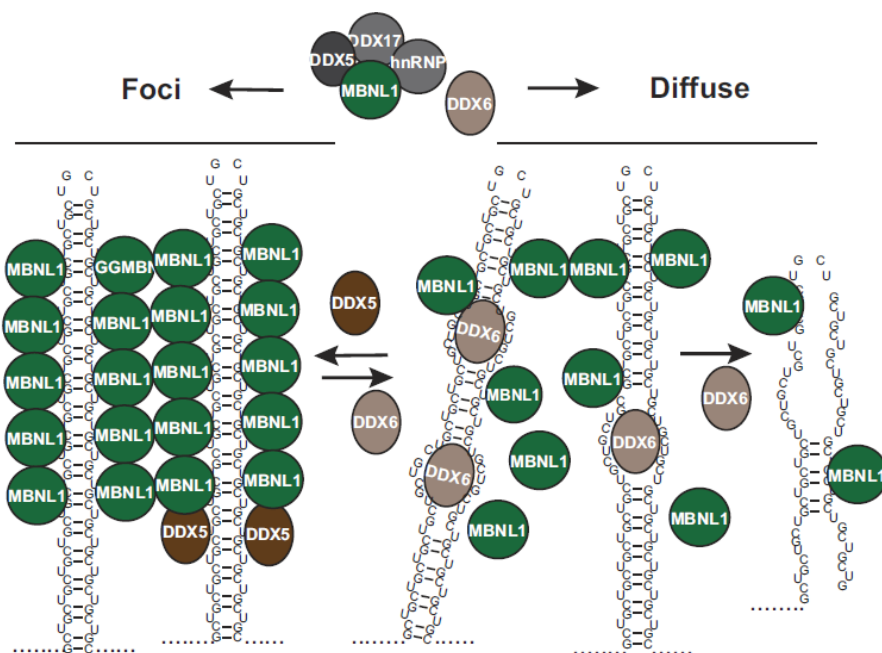


Figura D1. Modelo de homeostasis de los *foci* ribonucleares. Las expansiones CUG pueden permanecer en forma de *foci*/insoluble o en estado difuso/soluble. DDX5 y DDX6 ejercen un efecto opuesto sobre los *foci* promoviendo (DDX5) o restringiendo (DDX6) la unión de MBNL1 a las repeticiones permitiendo así los cambios dinámicos entre un estado en forma de *foci* a un estado difuso. Figura tomada de Pettersson *et al.*, 2015.

Además de estas helicasas, tal y como cuestionan Petterson y colaboradores, es posible que haya otros moduladores actuando sobre la homeostasis de los *foci* en el núcleo celular. El hecho de que la boldina tenga capacidad para reducir la formación de *foci* en células de pacientes sin provocar un aumento de la distribución de MBNL1 en el núcleo, podría estar relacionado con la regulación de la homeostasis de los *foci* ribonucleares. De este modo, la boldina podría estar actuando directamente como modulador de la homeostasis de los *foci*, o regular alguna de las proteínas que realiza dicha función, provocando el paso hacia un estado difuso. El hecho de mantener los *foci* en estado soluble implicaría una menor liberación de MBNL1 en comparación con la disolución total de dichos agregados. De este modo, al encontrarse en estado soluble, la detección de *foci* mediante hibridación *in situ* fluorescente mostraría una disminución del número de agregados sin que ello conllevara una liberación significativa de MBNL1 detectable mediante inmunohistoquímica.

Otro de los principales sucesos moleculares presente en los pacientes DM1, y que se ha relacionado con el aumento de MBNL1 libre, es la desregulación del *splicing* alternativo de numerosos transcritos. Utilizando mioblastos transdiferenciados a partir de fibroblastos de pacientes, seleccionamos las alteraciones de varios transcritos como herramienta para la caracterización final de la actividad de la boldina en un contexto humano. El tratamiento con boldina a una única concentración no modificó las alteraciones en el *splicing* de la ATPasa dependiente de calcio (SERCA) ni de la troponina T cardíaca (cTNT) en mioblastos portadores de 1.000 repeticiones CTG. El número de tripletes CTG se correlaciona de forma aproximada con la gravedad de los síntomas (Harley *et al.*, 1993) por ello, a fin de descartar una actividad leve de la boldina no apreciable en células con 1.000 repeticiones, repetimos el ensayo en mioblastos portadores de 333 repeticiones donde también se observaron las alteraciones en el *splicing* de *SERCA* y *cTNT* además de alteraciones en el *splicing* del receptor de la insulina (INSR). El tratamiento con boldina en un rango de concentraciones creciente no mejoró las alteraciones de dichos transcritos a ninguna de las dosis testadas, quedando así descartado que la falta de eficacia de la boldina sobre las alteraciones en el *splicing* de transcritos se debiera a un efecto de la dosis testada o fuera debido al tipo celular empleado.

Cabe recordar que la boldina fue identificada en un rastreo de compuestos basado en la identificación de moduladores del *esplíceosensor* DM1 en *Drosophila*, por lo que puede resultar contradictorio que la boldina mejore un suceso de *splicing* en mosca pero no en células humanas. Aunque existe una gran conservación entre *Drosophila* y mamíferos a nivel de *splicing* alternativo (Venables *et al.*, 2012), también se han descrito algunas diferencias (Mount *et al.*, 1992; Irion, 2012) por lo que la maquinaria de *splicing* en ambos modelos puede no tener el mismo comportamiento. En el modelo *esplíceosensor*, las moscas expresan el minigén del gen humano *INSR*, cuyo procesado alterativo resulta alterado en DM1. Dado que la regulación del *splicing* es

un proceso altamente complejo, los mecanismos por los que se da el *splicing* del minigén en *Drosophila* pueden ser diferentes a los ocurridos en células humanas, siendo el proceso en mosca más sensible a la acción de un compuesto químico. Además, cabe remarcar que la actividad de la boldina en el rastreo primario fue ligeramente inferior al umbral marcado para la determinación de un compuesto como positivo, por lo que esta actividad sobre la regulación del *splicing* podría quedar posteriormente enmascarada en un sistema más complejo como son las células humanas.

Al igual que lo sucedido en células derivadas de pacientes, el tratamiento con boldina tampoco mejoró las alteraciones en el *splicing* observadas en ratones DM1. Los ratones HSA^{LR} reproducen defectos en el *splicing* de transcritos diana de Mbnl1, tales como *Serca* y *Clcn1*. Aunque éramos conocedores de la falta de actividad de la boldina sobre estas alteraciones en células DM1, decidimos evaluar si esto se trataba de un hecho aislado consecuencia de las condiciones específicas en las que se testó el compuesto en el modelo celular, o si por el contrario, estos resultados eran realmente debidos al propio compuesto. La inyección intramuscular de boldina a 60 mg/Kg no mejoró las alteraciones en el *splicing* de *Serca* y *Clcn1*. Además en el caso de *Serca*, a parte del tratamiento habitual de una semana de duración, el *splicing* se midió tras un tratamiento más largo, de dos semanas de duración, lo que descarta que los resultados observados sean debidos a un tiempo de tratamiento insuficiente. Cabe destacar que la boldina se midió a una única dosis, coincidiendo según nuestros datos con la máxima dosis no tóxica del compuesto administrable en ratón por vía intramuscular, por lo que podría ser posible que fuera necesaria una mayor o menor concentración del compuesto para ver cambios en el *splicing* de transcritos. Ensayos *in vitro* han mostrado que la boldina puede tener efectos dependientes de dosis. Este compuesto regula la adipogénesis protegiendo a la hormona adiponectina frente al estrés oxidativo y la inflamación, siendo esta protección mayor tras el tratamiento con boldina a bajas concentraciones (10-15 μ M) que a concentraciones más altas (>50 μ M) (Konrath *et al.*, 2009). En cualquier caso, debido a que estos datos son idénticos a los obtenidos en cultivo celular, cabe esperar que la falta de eficacia de la boldina sobre las alteraciones en el *splicing* de transcritos en DM1 sea causada por su mecanismo de acción, y no por la metodología de ensayo empleada.

Aunque la desregulación del *splicing* presente en DM1 no es debida únicamente al secuestro de MBNL1, ratones *knockout* para *Mbnl1* reproducen varios fenotipos de la enfermedad entre los que se encuentran las alteraciones en el *splicing* (Kanadia, Johnstone *et al.*, 2003), lo que sugiere el papel clave de esta proteína en dicho proceso. Teniendo en cuenta nuestra hipótesis sobre el mecanismo de acción de la boldina en relación a los *foci* ribonucleares, tras el tratamiento con boldina gran parte de MBNL1 seguiría retenido en el núcleo celular sin poder realizar su actividad sobre el *splicing* de sus transcritos diana, lo que se correlaciona con la falta de actividad de la

boldina sobre las alteraciones en el *splicing* de transcritos observada en mioblastos DM1.

En la Introducción de este trabajo, describimos las diferentes estrategias que siguen aquellas moléculas descritas como anti DM1. Gran parte de estas moléculas toman el RNA tóxico como diana y actúan degradando el RNA portador de las repeticiones o inhibiendo la interacción RNA tóxico-proteínas. En el caso de la boldina, los datos obtenidos respecto a la distribución de MNBL1 y las alteraciones en el *splicing* de transcritos en células DM1 indican que el mecanismo de acción de la boldina se sitúa aguas abajo en el mecanismo de patogénesis de la enfermedad puesto que no implica una interacción directa con las repeticiones CTG.

5. El mecanismo de acción de la boldina se basa en una actividad a varios niveles

El boldo (*Peumus boldus* Mol.) es un árbol de origen chileno cuyas hojas han sido empleadas tradicionalmente en la medicina popular como un remedio natural frente a diferentes dolencias. Las hojas del boldo son ricas en diferentes alcaloides del tipo apomorfina siendo la boldina el más abundante.

Una de las propiedades más estudiada de la boldina es su potente efecto antioxidante. El estrés oxidativo, es causado de forma directa o indirecta por el daño provocado por las especies reactivas del oxígeno (ROS) sobre los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos y ha sido implicado en procesos tales como carcinogénesis, neurodegeneración, aterosclerosis, diabetes y envejecimiento (Ray *et al.*, 2012). Estudios llevados a cabo durante las últimas décadas, han mostrado que la boldina actúa sobre diferentes radicales libres influyendo sobre factores clave para la célula como la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y el metabolismo (Ray *et al.*, 2012). El efecto protector de boldina ha sido ampliamente estudiado en modelos de daño inducido por estrés oxidativo. Ensayos *in vitro* en células aisladas han mostrado que la boldina protege a los glóbulos rojos frente a lisis provocada por la acumulación de ROS (Sato *et al.*, 1995), inhibe la autooxidación espontánea de la membrana lipídica cerebral (Lissi *et al.*, 1986) y disminuye la peroxidación lipídica en hepatocitos (Martínez *et al.*, 1992), todo ello mediante la eliminación de radicales libres presentes en la célula. *In vivo*, en modelos de diabetes en ratón la boldina restaura los niveles del óxido nítrico atenuando el estrés oxidativo y mejorando la disfunción endotelial presente (Lau *et al.*, 2013). Otra propiedad de la boldina que parece estar relacionada con sus efectos sobre la eliminación de los radicales libres es su actividad antinociceptiva, ya que en ensayos de dolor inducido químicamente en ratón, la boldina produjo una rápida inhibición del dolor y un efecto antinociceptivo a nivel global (Zhao *et al.*, 2006). Por otra parte, la boldina como antioxidante, inhibe la síntesis de prostaglandinas, lo que

añade a las propiedades de este compuesto un efecto antiinflamatorio y antipirético que ha sido validado *in vivo* en diferentes modelos animales (O'Brien *et al.*, 2006).

Cabe destacar que estas propiedades antioxidantes de la boldina podrían ser de utilidad frente al tratamiento de la DM1. Recientemente, en un estudio llevado a cabo en 20 pacientes de esta enfermedad, Kumar y colaboradores describieron alteraciones en algunos enzimas implicados en la eliminación de ROS, alteraciones tales como el incremento en los niveles de superóxido dismutasas y la reducción de glutatión y glutatión-s-transferasa (Kumar *et al.*, 2014). Estos datos sugieren que el daño provocado por el estrés oxidativo está presente en las células de pacientes con DM1, por lo que podría jugar un papel importante en la progresión de la enfermedad. Además, tal y como se ha descrito anteriormente, el envejecimiento está ampliamente correlacionado con el estrés oxidativo por lo que el potencial antioxidante de la boldina podría estar jugando un papel importante sobre este proceso en DM1 siendo el responsable de la mejora en la supervivencia observado en moscas DM1 tratadas con boldina. En este sentido, en un rastreo manual realizado con anterioridad a este trabajo, utilizando las moscas modelo de DM1 y un fenotipo de letalidad producido por la expresión de las repeticiones tóxicas en el cerebro de *Drosophila*, se identificaron como positivos dos compuestos conocidos; los fármacos ketoprofen e indometacin. Ambos compuestos son antiinflamatorios no esteroideos con propiedades analgésicas y antipiréticas. Su efecto antiinflamatorio se debe a que, al igual que la boldina, inhiben la síntesis de prostaglandinas (www.drugbank.com), lo que apoya la tesis de que compuestos con propiedades antioxidantes y por ende antiinflamatorias pueden ser una posible familia farmacológica activa en DM1.

Además de las propiedades anteriormente descritas, diversos estudios han mostrado que la boldina tiene otro tipo de funciones no relacionadas con su actividad antioxidante que podrían resultar beneficiosas en un contexto celular DM1. Una de ellas su capacidad para actuar como antagonista de los canales Ca^{+2} (Eltze *et al.*, 2002). Estudios en vesículas de membrana del retículo sarcoplásmico de ratón expusieron que la boldina induce la liberación del Ca^{+2} intracelular en músculo esquelético (Kang y Cheng., 1998). Esta actividad de la boldina resulta de especial interés puesto que diversos estudios han mostrado que la ruta de señalización del Ca^{+2} se encuentra alterada en músculos y miotúbulos de pacientes y en ratones modelo de la enfermedad (Santoro *et al.*, 2014; Vallejo-Illarramendi *et al.*, 2014). Además, no hay que olvidar que uno de los transcritos cuyo *splicing* se ve alterado en pacientes DM1 es la ATPasa dependiente de Ca^{+2} del retículo sarcoplásmico (SERCA), proteína que se expresa en las fibras musculares de contracción rápida y permite que el Ca^{+2} del citoplasma vaya al interior del retículo sarcoplásmico ayudando a reducir los niveles de Ca^{+2} libre en condiciones basales (Kimura *et al.*, 2005).

Otra propiedad de la boldina de especial interés para estudios adicionales a realizar con esta molécula, son sus efectos conocidos sobre la relajación muscular en el tracto intestinal. La aplicación de boldina en el duodeno de ratón aumenta en un 60% el flujo biliar (Lévy-Appert-Collins, 1971). Además, la acción inhibitoria de la boldina sobre la acetilcolinesterasa provoca un aumento de la motilidad en el colon, siendo esta una de las razones por las que la boldina se usa en medicina tradicional para el tratamiento de dolencias digestivas y hepáticas (Muthna *et al.*, 2013). En este sentido, no hay que olvidar que las alteraciones musculares descritas en DM1 también afectan a la musculatura gastrointestinal por lo que los pacientes sufren molestias en estos órganos.

En general, la importante actividad antimiotónica de la boldina que hemos establecido en modelos murinos, unido al hecho de se hayan descrito interacciones de esta molécula con canales iónicos (O'Brien *et al.*, 2006), nos llevó a tratar de profundizar en el estudio de la actividad del compuesto sobre diferentes canales de membrana y su relación con el mecanismo de patogénesis de la DM1. Brevemente, los canales iónicos dependientes de voltaje se abren en respuesta a cambios en el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática con la finalidad de transmitir impulsos eléctricos (potencial de acción).

La entrada de Na^+ a través de canales de sodio activados por cambios de voltaje (I_{Na}) inicia la fase de despolarización del potencial de acción de las células nerviosas. En células cromafinas bobinas, la boldina, a la máxima concentración testada, provocó un bloqueo de I_{Na} mayor que el provocado por el tratamiento con mexiletine a la misma concentración. Las diferencias observadas entre ambos compuestos pueden ser debidas a que el mexiletine se une con una mayor afinidad a canales de sodio abiertos o inactivados, lo que resulta en una acción selectiva del mexiletine en tejidos patológicos (Conte-Camerino *et al.*, 2007). En cualquier caso, cabe destacar que la boldina únicamente interaccionó con las corrientes I_{Na} a una concentración alta, lo que se correlaciona con la elevada dosis terapéutica (50 mg/Kg) observada en modelos murinos. Recientemente, diversos autores han puesto de manifiesto que las alteraciones en las corrientes de sodio podrían contribuir a la disfunción cardíaca observada en ratones DMSXL (Algalarrondo *et al.*, 2015). Así mismo un estudio clínico ha revelado que los problemas cardíacos desarrollados por los pacientes de DM1 son similares a los observados cuando se da la pérdida de función de SCN5A, mutación que provoca alteraciones en el canal de sodio Nav1.5 y que es responsable del Síndrome de Brugada (Pambrun *et al.*, 2014). Dada la capacidad de la boldina de modular las corrientes I_{Na} , la evaluación de este compuesto en el ratón DMSXL permitiría tener una mayor información del potencial terapéutico de la boldina en los problemas cardíacos presentes en DM1.

La cuantificación de las corrientes de entrada a través de canales de calcio dependientes de voltaje en células cromafines bobinas, mostró que la boldina bloquea dichas corrientes de manera dosis dependiente y con una mayor cinética de inactivación que el mexiletine. Estos datos son consistentes con los publicados por Eltze y colaboradores (2002), y como ya se ha mencionado anteriormente, podrían ser de especial relevancia dadas las alteraciones en la ruta de señalización del calcio asociadas a la DM1. Además de las alteraciones en el splicing de SERCA, la DM1 también causa la espliceopatía del receptor de la rianodina RyR1 (Kimura *et al.*, 2005), un canal de calcio que se expresa mayoritariamente en el músculo esquelético. Las alteraciones en RyR1 aumentan la despolarización inducida por la liberación de Ca^{+2} , alteración que parece agravar la miopatía a través de la activación de proteasas dependientes de calcio (Kimura *et al.*, 2009). Otro canal de calcio implicado en DM1 es Cav1.1 cuyo *splicing* se ve alterado por la presencia de las repeticiones tóxicas. La no inclusión del exón 29 de Cav1.1 provoca un incremento en la conductancia del canal, lo que se traduce en un mayor influjo de Ca^{+2} hacia el interior celular (Tang *et al.*, 2011). Dada la relación entre las alteraciones en canales de calcio y la miopatía y el desgaste muscular presentes en la DM1, sería interesante conocer en profundidad el tipo de afinidad que la boldina tiene sobre esta familia de canales.

Aunque no son muchos los trabajos sobre las alteraciones de canales iónicos dependientes de voltaje en DM1, en 1994 Behrens y colaboradores describieron que las variaciones en la sensibilidad de canales K^+ podrían participar en el mecanismo por el que se genera la miotonía en DM1. Tanto la boldina como el mexiletine a 100 μ M bloquean las corrientes de salida a través de canales K^+ siendo mayor el bloqueo provocado por el mexiletine. Aunque serían necesarios datos complementarios, el bloqueo de dichas corrientes podría suponer una de las causas por las que la boldina muestra su efecto antimiotónico en ratones HSA^{LR}.

La boldina no solo interacciona con los canales ya citados si no que también bloquea las corrientes de entrada a través de receptores nicotínicos neurales de forma dependientes de dosis, lo que confirma que la boldina posee un potencial de acción de amplio espectro sobre el bloqueo de diferentes canales iónicos. Cabe destacar, que el efecto de la boldina sobre los diferentes canales testados se da a una concentración alta (100 μ M), lo que se correlaciona con la elevada dosis terapéutica observada *in vivo* para este compuesto.

En resumen, nuestra hipótesis sobre el mecanismo de acción de la boldina en DM1 se basa en una suma aditiva de varios mecanismos que en su globalidad favorecen a la célula DM1. Por una parte, el potencial antioxidante de la boldina estaría contribuyendo a una mejora del estrés oxidativo presente en la célula DM1, efecto que queda reflejado en el aumento de la longevidad en moscas DM1 tratadas con boldina. Así mismo, la boldina estaría actuando sobre la modulación de la homeostasis de los

foci ribucleares y sería un regulador de canales iónicos implicados en el desencadenamiento de la miotonía en modelos murinos.

6. Estudios toxicológicos y de seguridad de la boldina

El prolongado uso de la boldina en medicina tradicional sugiere que este compuesto debe de tener una baja toxicidad. De hecho, la DL₅₀ de este compuesto determinada en fibroblastos DM1 fue de 850 μ M, concentración muy alejada de la dosis terapéutica, estimada en estas células en 100 μ M. Estudios *in vivo* llevados a cabo por diferentes investigadores ha mostrado que son necesarias dosis relativamente altas para provocar efectos secundarios, toxicidad o letalidad en varias especies de mamíferos. Los primeros estudios sobre la toxicidad de este compuesto reportaron que son necesarios 500 y 1000 mg/kg (vía oral), y 250 y 50 mg/kg (vía intravenosa) para provocar la muerte de ratones y cerdos de guinea respectivamente y estimaron la DL₅₀ en ratón en 250 mg/kg (intraperitoneal) (O'Brien *et al.*, 2006). La mayoría de los animales incluidos en estos estudios de toxicidad murieron por un fallo respiratorio. En nuestros estudios de toxicidad realizados en el ratón modelo de DM1 HSA^{LR} estas cifras difieren significativamente de las anteriormente descritas. Una única dosis de 150 mg/kg fue suficiente para causar la muerte tras la administración intraperitoneal, mientras que la dosis tóxica por vía oral fue cinco veces menor que la publicada. La mayoría de los experimentos en ratón incluidos en este trabajo fueron realizados mediante la administración por vía intramuscular de la boldina siendo la máxima dosis inyectada de 60 mg/Kg. Esta dosis no resultó tóxica aunque sí que causó pequeños efectos secundarios como dolor tras su administración. La ventana terapéutica de un fármaco es el rango por el cual puede utilizarse sin provocar efectos tóxicos o letales en el organismo vivo. En ratones DM1, la máxima actividad de la boldina a nivel de reducción de la miotonía se observó a 50 mg/kg (i.m.) por lo que teniendo en cuenta que a 60 mg/kg aparecen ciertos efectos secundarios, es posible que para su uso como anti-DM1 la ventana terapéutica de este compuesto no sea muy amplia. Resulta interesante el hecho de que en otros estudios publicados en los que se evalúan las propiedades terapéuticas de la boldina las concentraciones a las que el compuesto parece eficaz *in vivo* e *in vitro* son similares a las que nosotros hemos identificado en este trabajo. Por ejemplo, la boldina mostró un efecto antioxidante en células neuronales en un rango de entre 10-100 μ M (Young *et al.*, 2000) así como un posible efecto neuroprotector en ratones tras la inyección de boldina a 40 mg/kg (Loghin *et al.*, 2003). Es posible que esta dosis terapéutica tan elevada sea consecuencia de las propiedades farmacocinéticas de la boldina y sea una de las causas por las que este compuesto a pesar de estar ampliamente descrito nunca se ha llevado a la clínica.

Considerando el potencial de la boldina como un posible agente de utilidad terapéutica, es importante valorar en un estadio temprano del desarrollo farmacológico los posibles efectos adversos asociados a este compuesto. Los fármacos pueden provocar toxicidad cardíaca provocando diversos tipos de efectos desfavorables sobre el corazón tales como, arritmias, síndrome que QT largo adquirido, insuficiencia cardíaca o hipertensión. Por ello, es importante conocer la influencia de un candidato a fármaco sobre las distintas fases del potencial de acción cardíaco. Para este estudio, seleccionamos tres canales iónicos que son habitualmente estudiados en los procesos de desarrollo de fármacos en la industria farmacéutica, el canal de sodio Nav1.5, responsable de la Fase 0 de despolarización, el canal de calcio Cav1.2 involucrado en la Fase 2 de meseta, y el canal de potasio hERG, implicado en la Fase 3 de repolarización. En estos ensayos la boldina fue testada a una concentración máxima de 50 μ M sin mostrar una actividad específica sobre ninguno de los tres canales. Estos datos sugieren que en el rango de concentraciones testadas, no se espera cardiotoxicidad asociada al tratamiento con boldina.

Dado que la boldina es un compuesto ampliamente estudiado, existen publicados otros datos de seguridad farmacológica. Tal y como se revisa en O'Brien y colaboradores (2006), la boldina ha mostrado ser segura en diferentes ensayos de genotoxicidad tales como el test de Ames y el test mutación génica en *Saccharomyces cerevisiae*. Además el tratamiento con boldina no introdujo alteraciones cromosómicas o aumentó la recombinación entre cromátidas hermanas en linfocitos humanos (boldina a 40 μ g/ml) o *in vivo* en células óseas de ratón (900 mg/kg administración oral). En estudios de seguridad oral subcrónica la boldina mostró un bajo nivel de hepatotoxicidad medido como los niveles de transaminasas y urea en sangre de ratas tratadas oralmente con boldina a 500 mg/kg durante 60 días (Almeida *et al.*, 2000).

7. Propiedades farmacocinéticas

El conocimiento de las propiedades farmacocinéticas de un candidato a fármaco es un paso crítico a la hora de determinar si es conveniente o no continuar con su desarrollo farmacológico. En este sentido, como una primera aproximación llevamos a cabo un perfil farmacológico de la boldina que aunque no fue completo, nos ha permitido dilucidar cual puede ser el comportamiento de este compuesto durante su paso por el organismo. Según los datos obtenidos en el ensayo de permeabilidad en un modelo intestinal *in vitro*, la boldina es un compuesto permeable por lo que tras su administración oral esta molécula podría ser absorbida a través de la superficie intestinal. Estos datos *in vitro* correlacionan con los datos obtenidos *in vivo* en el modelo murino de mionía inducida en el que una única dosis de boldina

administrada de forma oral redujo los niveles de miotonía. Sin embargo, cabe destacar que la administración oral de boldina en el ratón HSA^{LR} no produjo ninguna mejora sobre este fenotipo. Dado que la boldina tiene una buena permeabilidad tanto *in vivo* como *in vitro* pensamos que la falta de actividad a nivel sistémico en ratones DM1 puede no ser debida al menos en su totalidad a un problema de absorción si no que podría ser debido a problemas en otras propiedades farmacocinéticas.

Según han descrito Jiménez y Speisky (2000) la boldina tiende a acumularse en los hepatocitos. En estudios de distribución en rata, tras la administración intravenosa y oral de boldina los niveles del compuesto en plasma descienden rápidamente acumulándose mayormente en el hígado y en menor manera en cerebro y el corazón. La boldina se elimina por metabolismo de fase II mediante reacciones de conjugación que por regla general inactivan el fármaco. En el estudio de distribución de la boldina incluido en este trabajo, nuestros datos tras la administración intravenosa de 20 mg/kg de boldina en ratón mostraron que al igual que lo sucedido en rata, la boldina se distribuye rápidamente. Prácticamente a los 5 minutos tras su administración se alcanza un equilibrio en la distribución siendo los niveles del compuesto el cerebro mayores que los niveles en plasma. Así mismo, el estudio de distribución de la boldina en ratón ha revelado que tras una absorción rápida, la boldina parece tener una vida media corta dado que a los 30 minutos tras la inyección intravenosa la concentración en plasma y tejidos es cercana a cero, lo que de cara a su desarrollo farmacológico podría suponer un intervalo de aplicación de la boldina excesivamente corto.

Cabe destacar que a diferencia de otras moléculas anti DM1 tales como los AONs, la boldina es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica llegando al cerebro tanto tras su administración por vía oral (datos publicados en rata) e intravenosa. Tal y como se ha citado anteriormente, los pacientes de DM1 sufren un declive cognitivo que ha sido relacionado tanto con alteraciones a nivel genético como con daño en la sustancia blanca del cerebro (Caso *et al.*, 2014) y que se asemeja al observado en procesos de envejecimiento acelerado (Mateos-Aierdi *et al.*, 2015). Aunque la boldina no interacciona directamente con las repeticiones tóxicas, dadas algunas de sus propiedades farmacológicas como su potencial antioxidante podría resultar beneficiosa para paliar ciertos procesos de envejecimiento en células DM1. En este sentido, dado que los ratones modelo de DM1 DMSXL muestran alteraciones a nivel cognitivo tales como la falta de búsqueda de la novedad, ansiedad, defectos en la memoria espacial y anhedonia (falta de reactividad a los estímulos habitualmente placenteros)(Hernández-Hernández *et al.*, 2013) la evaluación de la actividad de la boldina sobre estos fenotipos proporcionaría una valiosa información acerca del potencial farmacológico de este compuesto sobre las alteraciones a nivel del SNC de los pacientes de DM1.

Además de una vida media corta, la administración de boldina en ratón mediante diferentes rutas de administración ha revelado una actividad desigual del compuesto según la vía de administración. Tras su administración intramuscular la boldina reduce la miotonía en ratón observándose el efecto transcurridos dos días desde el último tratamiento. Este efecto no se observa cuando el compuesto es administrado a nivel sistémico por las vías intragástrica e intraperitoneal. El hecho de que la boldina únicamente funcione a nivel local pone de manifiesto que las propiedades farmacocinéticas de esta molécula podrían no ser óptimas para su posterior desarrollo farmacológico. Aunque no tenemos datos concluyentes, es posible una vez administrada a nivel sistémico ya sea por un déficit en la distribución del compuesto o por otras causas relativas a la absorción o al metabolismo de la molécula, la cantidad de boldina que llega al músculo sea inferior a la necesaria para observar un efecto a nivel fenotípico. A este respecto, cabe recordar que la dosis terapéutica determinada para la boldina en nuestros ensayos *in vivo* e *in vitro* es alta, por lo que una disminución en la cantidad de compuesto que llega a los órganos y tejidos diana una vez entra en el organismo, sería suficiente como para no observar una actividad sistémica.

8. Potencial de la boldina como molécula anti DM1

En este trabajo hemos caracterizado la actividad anti DM1 de la boldina, un alcaloide de estructura conocida identificado en un rastreo de compuestos a gran escala en modelo de DM1 en *Drosophila*. La boldina suprime fenotipos ligados a esta enfermedad tanto en mosca como en ratones y líneas celulares derivadas de pacientes. Además actúa tanto a nivel molecular, inhibiendo la formación de *foci* como a nivel fenotípico reduciendo la miotonía, sin observarse efectos secundarios o toxicidad a las dosis efectivas.

Aunque la boldina no se une a las repeticiones tóxicas, en un contexto DM1 este compuesto muestra diferentes mecanismos de acción que contribuyen a revertir varias de las alteraciones provocadas por la enfermedad. La boldina es un compuesto conocido con diferentes propiedades farmacológicas descritas y ampliamente utilizado en medicina tradicional lo que indica que este compuesto podría ser apto para el consumo humano. Además el hecho de obtener resultados en distintas especies, incluidas las células humanas hace prever que probablemente este compuesto lleve a cabo las mismas acciones en humanos siendo una posible terapia para los pacientes de DM1 tanto sola como combinada con otras moléculas con diferente mecanismo de acción.

Aunque la actividad de la boldina observada en los diferentes modelos de DM1 hace que esta molécula pueda ser considerada como un candidato a fármaco, a la hora de continuar con el desarrollo farmacológico de un compuesto es crítico determinar sus propiedades toxicológicas y farmacocinéticas. En este sentido, como parte del tercer objetivo de este trabajo, hemos observado que la boldina parece ser una molécula con un buen perfil de seguridad farmacológica, por lo que a ese nivel podría considerarse un buen candidato a fármaco siempre y cuando se disminuyera la dosis terapéutica en modelos animales de DM1. Sin embargo, el efecto terapéutico de la boldina se restringe únicamente a nivel local. La Distrofia Miotónica es una enfermedad altamente compleja en la que se ven afectados prácticamente todos los órganos y sistemas del cuerpo humano por lo que a la hora de desarrollar un fármaco frente a esta enfermedad es importante que, independientemente de la vía de administración, el compuesto sea capaz de actuar a nivel sistémico. Sin embargo, respecto al perfil de seguridad farmacológica, la boldina parece ser una molécula segura por lo que podría considerarse un buen candidato a fármaco siempre y cuando se disminuyera la dosis terapéutica en modelos animales de DM1.

Por ello, como vía para el desarrollo farmacológico de la boldina proponemos llevar a cabo un proceso de química médica mediante el que a partir del diseño computacional y teniendo en cuenta las diferentes características farmacológicas de la boldina se sinteticen moléculas derivadas de la boldina con una igual o mejor actividad terapéutica, pero con eficacia a nivel sistémico.

En conjunto, en este trabajo proponemos a la boldina como una molécula con capacidad para mejorar diferentes fenotipos DM1 *in vivo*, abriendo una vía de estudio en el desarrollo de nuevas terapias contra esta enfermedad, aportando además un nuevo enfoque a la hora de identificar moléculas con un mecanismo de acción ligado al mecanismo de patogénesis de esta enfermedad.

Conclusiones

Conclusiones

Conclusiones Las conclusiones que pueden extraerse de los resultados presentados en este trabajo son:

1. Mediante el testeado de compuestos *in vivo* en un modelo de DM1 en *Drosophila* hemos descubierto que la boldina, un alcaloide de origen natural, constituye un agente potencialmente terapéutico para la enfermedad. Basamos esta conclusión en que:
 - a. La boldina mejora el splicing de un reportero humano en *Drosophila* y reduce la formación de foci ribonucleares, siendo este un fenotipo histopatológico característico de la Distrofia Miotónica de tipo 1 .
 - b. La boldina revierte la formación de *foci* ribonucleares en fibroblastos derivados de pacientes DM1.
 - c. En un modelo de la enfermedad; ratones HSA^{LR}, la boldina reduce fenotipos funcionales de DM1 provocando una disminución de la miotonía típica de la enfermedad.
2. La boldina actúa aguas abajo en el mecanismo de patogénesis de la DM1 ya que no interacciona directamente con las repeticiones CUG ni libera el factor de splicing MBNL1 secuestrado por las repeticiones.
3. Los datos obtenidos sugieren que la boldina actúa en varios niveles modulando la homeostasis de los foci ribonucleares y regulando canales iónicos implicados en el origen de la miotonía.
4. Los estudios de toxicidad realizados la boldina tiene un buen perfil de seguridad farmacológica aunque, respecto a la mejora de fenoripos DM1, con una ventana terapéutica pequeña.
5. Las propiedades farmacocinéticas de la boldina no son las óptimas para su posterior desarrollo farmacológico ya que sólo se observa actividad del compuesto a nivel local siendo necesaria la actividad a nivel sistémico.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

I. Experimentos con *Drosophila*

1. Materiales

1.1 Cepas de *Drosophila melanogaster* I

A continuación se describen las líneas de mosca utilizadas en este trabajo. Todos los ensayos se llevaron a cabo a 25°C, salvo que se especifique lo contrario, en medio nutritivo estándar (ver receta en el apartado 2.1).

MI.1.1 Cepas de <i>Drosophila melanogaster</i>		
	Genotipo	Origen
Cepas de referencia	$y^1 w^{1118}$	Bloomington stock center
Líneas UAS	$yw; +; UAS-CTG_{(480)} 1.1$	Garcia-Lopez <i>et al.</i> , 2008
	$w; UAS-INSR:Luc\#6$	Garcia-Alcover <i>et al.</i> , 2014
	$w; UAS-luciferasa$	Generadas por Valentia Biopharma
Líneas Gal4	$MHC-Gal4(Cr.2)$	Dr. G.Davis (University of California, California, EEUU)

1.2 Kits I

Luciferase Assay System (Promega)

1.3 Equipos I

Estación de pipeteo Biomek FX^P (Beckman Coulter)

Distribuidor de embriones de *Drosophila* COPAS PLATFORM (Unión Biométrica)

Lector de placas Envision Multilabel Reader (Perkin Elmer)

2. Métodos

2.1 Preparación de medio de cultivo para llevar a cabo los experimentos en *Drosophila*

En todos los casos se utilizó medio de cultivo estándar (Ashburner, 1989).

Para la preparación de 80 tubos/40 botellas se mezclaron los siguientes ingredientes:

- H₂O 1 l
- Agar 10.5 g
- Levadura 60 g
- Harina de soja 10 g
- Harina de maíz 60 g
- Azúcar 50 g

Antifúngico:

- Ác. Propiónico 5 ml
- Etanol 10 ml
- Nipagin 3 g

Preparación:

- Disolver el agar con la mitad de agua hasta que hierva
- Disolver el resto de componentes, excepto el antifúngico, con el resto de agua y añadir el agar hirviendo
- Remover la mezcla hasta que espese y retirar del fuego
- Esperar 5 minutos y añadir el antifúngico previamente disuelto
- Dosificar

2.2 Ensayo de 8 puntos

2.2.1 Preparación de la placa de muestreo.

Con el robot pipeteador Biomek FX^P se dispensaron 5 µl de boldina, con una concentración final de 12.5 µM, en una fila de ocho pocillos consecutivos de una placa de 96 pocillos conteniendo 250 µl de medio de cultivo de *Drosophila*. Se prepararon 2 placas réplica. En la primera fila de cada placa se dispuso el control (DMSO 0.25%). Cada uno de los pocillos se sembró con una larva L1 de genotipo *MHC-Gal4>UAS-INSR:Luc#6;UAS-i(CTG)₄₈₀* mediante el dispensador de embriones COPAS. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 2 semanas, periodo tras el cual se congelaron manteniéndose a -20°C hasta el día de la lectura de datos.

2.2.2 Cuantificación de la actividad luciferasa en *Drosophila*

Para la cuantificación de la actividad luciferasa se homogeneizó la mosca adulta presente en cada uno de los pocillos en 150 µl de tampón 1X del kit Luciferase Assay System (Promega). De cada homogenado se transfirieron 50 µl a placas blancas de 96 pocillos (Nunc), donde se añadieron 10 µl de reactivo de luciferasa por pocillo utilizando el dispensador del lector de placas Envision Multilabel Reader. Los niveles de luciferasa se midieron utilizando este mismo lector de placas. Las diferencias entre ambos grupos se calcularon mediante el test t de student de dos colas y $\alpha=0.05$.

2.3 Estudio del efecto directo de la boldina sobre la expresión de la luciferasa y el sistema Gal4/UAS

Para la preparación de las placas de muestreo se siguió el método descrito en el apartado 2.2.1. Para el estudio del efecto de la boldina sobre la expresión de la luciferasa, en cada uno de los pocillos se sembraron 3 larvas L1 del genotipo *MHC-Gal4;UAS-Luc*, mientras que para el estudio del efecto de la boldina sobre el sistema Gal4/UAS se sembraron 3 larvas L1 del genotipo *Mhc-Gal4>UAS-INSR:Luc#6*.

Para la cuantificación de los individuos y la posterior determinación de la actividad luciferasa se siguió la metodología descrita en García-Alcover *et al.*, 2014.

2.4 Detección de los foci ribonucleares en *Drosophila*

2.4.1 Preparación de los viales de muestreo

En viales de vidrio de 5 ml de capacidad (Fisher) se dispensaron 500 µl de medio de cultivo de *Drosophila* con el robot pipeteador Biomek FX^P. En 3 viales se dispensó boldina a una concentración final de 12.5 µM y en otros 3 viales se dispensó DMSO (0.25%). En cada uno de los viales se sembraron 10 larvas L1 de genotipo *MHC-Gal4>UAS-INSR:Luc#6;UAS-i(CTG)₄₈₀* mediante el dispensador de embriones COPAS. Los viales fueron incubados a 25°C durante 2 semanas, periodo tras el cual se congelaron manteniéndose a -20°C hasta el día de la lectura de datos.

2.4.2 Preparación de la muestra

Los tórax de los adultos a analizar se fijaron durante una noche en paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C. Posteriormente se mantuvieron en una solución de sacarosa 30% en PBS durante 2 días. Transcurrido dicho tiempo de incubación, los tórax fueron embebidos en OCT, congelados en nitrógeno líquido y mantenidos a una temperatura de -80°C hasta su procesado. Durante su procesado, se obtuvieron secciones transversales de 15 µm con el criotomo Leica CM 1510S.

2.4.3 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Los portaobjetos con los cortes de tórax se lavaron tres veces con PBS 1X (cada lavado tuvo una duración de 5 min). Se añadió a los portaobjetos tampón de acetilación fresco (580 µl de trietanolamina 0.1 M y 125 µl de acético anhídrido 0.25 % (v/v) en 50 ml de agua). Tras 10 min de incubación, se lavaron tres veces (cada lavado tuvo una duración de 5 min) con PBS 1X y se prehibridaron durante 30 min con solución de hibridación (10 ml formamida desionizada, 12 µl de 5 M NaCl, 400 µl de 1 M Tris-HCl pH=8, 20 µl 0.5 EDTA pH=8, 2 g Dextrano sulfato, 400 µl solución Denhart's 50X, 1 ml de esperma de arenque (10 mg/ml), H₂O hasta un volumen final de 20 ml). Se utilizó la sonda marcada Cy3-^{5'}CAGCAGCAGCAGCAGCA^{3'}-Cy3 (Sigma), que tras calentarla a 65°C

durante 5 min se añadió a los portaobjetos disuelta en tampón de hibridación (1/100). La sonda se dejó hibridar a 37°C durante una noche en una cámara húmeda en oscuridad. Al día siguiente, los portaobjetos fueron lavados con SSC 2X (2 lavados de 15 min) y PBS (3 lavados de 5 min de duración), manteniendo las preparaciones a 32°C. Finalmente se montaron los portaobjetos con Vectastain y se tomaron imágenes utilizando un microscopio óptico Leica DM2500 con el objetivo de 40X. Se analizaron imágenes de al menos tres campos distintos para cada individuo y se analizó un mínimo de tres individuos por grupo. La cuantificación del número de *foci* por célula se llevó a cabo utilizando el programa de análisis de imagen Photoshop. Las diferencias entre grupos se analizaron usando un test t-student de dos colas y $\alpha=0.05$.

2.5 Ensayo de longevidad

Se colocaron 15 machos de genotipo *MHC-Gal4>UAS-(CTG)₄₈₀* recién nacidos en tubos conteniendo DMSO (0.25%) o boldina (50 μ M) disueltos en 3 ml de medio nutritivo de *Drosophila* (ver apartado 2.1). Como control positivo se utilizaron 15 machos de la misma edad de la cepa de referencia *yw* colocados en tubos con DMSO (0.25%) disuelto en 3 ml de medio nutritivo. Se realizaron 4 réplicas por compuesto, con un total de 60 moscas finalmente analizadas. Cada 2-3 días, las moscas fueron transferidas a un tubo nuevo con comida y compuesto recién preparados. En cada cambio se cuantificó el número de individuos muertos. Los resultados fueron representados mediante curvas de supervivencia Kaplan-Meier, en las que se representa el número de supervivientes en función del tiempo contabilizado en días. Las curvas de ambos compuestos se compararon utilizando el test de Kaplan-Meier con el programa Graphpad.

II. Experimentos *in vitro*

1. Materiales

1.1 RNAs II

Los RNAs fueron sintetizados por la empresa Metabion (www.metabion.com), con una escala de síntesis de 1 μ mol y purificados por HPLC. Todos los RNAs se resuspendieron en agua libre de RNAsas y las alícuotas se conservaron a una temperatura de -80°C.

MII.1.1 RNAs utilizados en los ensayos <i>in vitro</i>		
Nombre	Secuencia	Experimento
<i>FAM-CUG4</i>	FAM-GCUG CUG UUCG CUG CUG	Retardo en gel
<i>CUG4</i>	GCUG CUG UUCG CUG CUG	Retardo en gel
<i>FAM-CUG23</i>	FAM-CUG CUG	Polarización de fluorescencia

2. Métodos

2.1 Ensayo de Retardo en Gel con sonda Fluorescente

Para llevar a cabo el ensayo de retardo en gel se calentó a 70°C durante 5 min una alícuota de RNA carboxifluoresceína (FAM)-CUG4 diluido a una concentración de 300 nM en tampón de unión (25 mM Tris-HCL pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 μM ZnCl₂, 10% glicerol) en un volumen final de 10 μl. El RNA se incubó con boldina (a las concentraciones de 0.03 mM, 0.5 mM, 4 mM y 8 mM) ó DMSO (control) a 37°C durante 10 min. A cada una de las muestras se le añadió tampón de carga 5X (20% sacarosa, 100 mM Tris-Bórico (TB) pH8, 25 mM MgCl₂, 0.1% azul de bromofenol) y se dejaron enfriar en hielo. Posteriormente se cargaron en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 8% sin EDTA (ver protocolo de preparación en el apartado 2.3.2) sometidos previamente a una corriente de 100 V durante 30 min. La electroforesis se llevó a cabo en TB 1X suplementado con 5 mM MgCl₂ y 50 μM ZnCl₂ con un pH de 8.5 a una temperatura de 4°C en cubetas Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad) a 240 V durante aproximadamente 30 min. Las imágenes de los geles se tomaron con el escáner de fluorescencia Typhoon 9400 (GE Healthcare) utilizando filtros de emisión 520 BP y 526 SP. La cuantificación de la intensidad de la banda libre de RNA se realizó mediante el uso del software Image J. El valor EC50 se calculó mediante un análisis de regresión no lineal.

2.2 Ensayos de Polarización de Fluorescencia

La sonda FAM-CUG23 (RNA sintético compuesto por 23 repeticiones CUG y conjugado en 5' con el fluoróforo carboxifluoresceína) se calentó a 70°C durante 10 min. Tras dejarse enfriar a temperatura ambiente, dicha sonda se incubó con boldina o 1% de DMSO (control) en tampón de lisis (25 mM Tris-HCL pH 7.5, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 50 μM ZnCl₂, 10% glicerol y 0.05% Tween 20) durante 20 min en hielo y en oscuridad. Para obtener una curva de unión de la boldina a FAM-CUG23 (6nM), la boldina se utilizó a 0.1 mM, 0.01 nM y 1 mM. Como control positivo, la sonda FAM-CUG23 (6nM) se incubó con pentamidina (P0547-Sigma) a varias concentraciones (0.01 mM, 0.1 mM,

1 mM). Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas negras de 96 pocillos con un total de 4 réplicas por ensayo y en un volumen final de 200 µl por pocillo

Las medidas de polarización se obtuvieron en un lector de placas Envision (Envision 2104, Perkin Elmer) utilizando el filtro de excitación FP480 y el filtro de emisión FP535. Se calcularon los valores de milipolarización (mP) para cada uno de los compuestos siguiendo la fórmula $[mP=1000 \times (S-G \times P)/(S+G \times P)]$, donde S y P fueron las cuentas fluorescentes relativas a los planos paralelo (S) y perpendicular (P) del filtro de excitación y G (factor rejilla) fue un factor dependiente del equipo. Los resultados fueron normalizados a los valores del control negativo (DMSO). Las diferencias entre grupos se analizaron usando un test t-student de dos colas y $\alpha=0.05$.

2.3 Preparación de electroforesis

2.3.1 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Para la separación y visualización de fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa a distintas concentraciones en función del tamaño de los fragmentos a resolver. La agarosa se preparó en tampón TBE 1X (Tris-borato EDTA), tampón también utilizado durante la electroforesis. Para resolver las muestras en el gel, las muestras se prepararon en tampón de carga 5X: 500 µl de agua, 496 µl de tampón de bromofenol (glicerol al 50%, azul de bromofenol al 0.5% y 100 mM EDTA pH 8.0) y 4 µl de Gel Red (Biotium). La visualización de los diferentes fragmentos se llevó a cabo con una lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda 312 nm.

2.3.2 Electroforesis de geles no desnaturizantes de poliacrilamida

Para llevar a cabo los experimentos de retardo en gel se utilizaron geles nativos (no desnaturizantes) de poliacrilamida al 6%, según la siguiente composición:

Para 20 ml (2 geles)

- 3 ml acrilamida:bisacrilamida 37.5:1
- 1 ml TB (Tris-Bórico, sin EDTA) 10X
- 200 µl APS
- 20 µl TEMED
- 15.78 ml H₂O

Las muestras se prepararon en tampón de carga (para 5X: 20% sacarosa, 100 mM Tris-Bórico pH 8, 25 mM MgCl₂, 0.1% azul de bromofenol). Los geles se resolvieron en tampón TB 0.5X suplementado con 5mM MgCl₂ y 50 µM ZnCl₂ con un pH de 8.5. La visualización de los geles se realizó en un escáner de fluorescencia (Tryphoon 9400, Amersham) a 500-600V utilizando los filtros de emisión 520BP y 526SP.

III. Experimentos en ratón

Todos los experimentos de este trabajo han sido aprobados por el comité de ética de experimentación animal de la Universidad de Valencia (2014/005/uveg/021).

1. Materiales

1.1 Cepas de ratón III

Las siguientes cepas de ratón fueron utilizadas a lo largo de este estudio.

MIII.1.1 Cepas de ratón utilizadas		
Cepa	Descripción	Origen
FVB	Genotipo de referencia	Harlan (www.harlan.com)
HSA ^{LR}	Transgénicos que expresan 250 repeticiones CTG bajo el control del promotor de la <i>actina de músculo esquelético humano</i>	Dr. Thornton (university of Rochester NY, EEUU) (Mankodi et al., 2003)
CD-1	Genotipo de referencia	Charles Rivers (www.criver.com)

1.2 Cebadores III

MIII.1.2 Cebadores utilizados en los experimentos en ratón		
Cebadores utilizados para el genotipado de ratones		
Nombre	Secuencia	Ta y Ciclos
HSA 23	AAACTTACATCTTCCCATGCTCC	62°C, 25 ciclos
HSA 24	GAGACGCCCTCTGAGAAACAG	
MSA 1	TCCTCAGGACGACAATCGAC	62°C, 25 ciclos
MSA 2	CCTAAGGAGTTCACCCAGTCTG	
HSA 10	TCCACCGCAAATGCTTCTAGACACAC	60°C, 21 ciclos
HSA 18	GCAGGGGAGCATGGGAAGATGTAAG	
Cebadores utilizados en la RT-PCR		
Nombre	Secuencia	Ta y Ciclos
Serca e21F	GTCATGGTCCTCAAGATCTCAC	58°C, 25 ciclos
Serca e23R	GGGTCAGTGCCTCAGCTTTG	
Clc e6F	TTCACATCGCCAGCATCTGTGC	58°C, 27 ciclos
Clc e8R	CACGGAACACAAAGGCACTGAATGT	
Gadph F	ATCAACGGGAAGCCCATCAC	58°C, 25 ciclos
Gadph R	CTTCCACAATGCCAAAGTTGT	

1.3 Kits III

DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen)

2. Métodos

2.1 Genotipado de los ratones HSA^{LR}

Siguiendo el método descrito en el trabajo de Tesis Doctoral de Irma García Alcover (2015), se realizaron genotipados puntuales de individuos seleccionados al azar para confirmar la presencia de las 250 repeticiones CTG en los miembros de la colonia.

2.1.1 Obtención de DNA genómico

Tras el destete del ratón, se obtuvi 1cm de cola de cada individuo a genotipar. Todas las muestras obtenidas se congelaron a una temperatura de -20°C hasta el momento de la extracción del DNA genómico con el kit DNeasy Blood & Tissue (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.2 HSA/MSA multiplex PCR

Mediante esta PCR fuimos capaces de amplificar tanto el gen de la actina murina (MSA) como el gen de la actina humana (HSA) portador de las repeticiones. Para la PCR se utilizó 2 µl del DNA extraído mediante el método descrito en el apartado anterior (aprox. 100 ng) como molde de la PCR junto con 10 µl del tampón Flexi GoTag, 5 µl de Mg⁺², 2.5 µl dNTPs (4 µM), 3.8 µl del cebador HSA 23 (4 µM), 3.8 µl del cebador HSA 24 (4 µM), 3.8 µl del cebador MSA 1 (4 µM), 3.8 µl del cebador MSA 2 (4 µM), 0.25 µl de polimerasa GoTaq y H₂O libre de DNAsas hasta un volumen final de 50 µl. La amplificación se llevó a cabo mediante un ciclo de desnaturalización de 10 min, 25 ciclos de amplificación formados por un paso de desnaturalización de 30 s a 95°C, un paso de hibridación de 30 s a 62°C y un paso de elongación de 30 s a 72°C. El producto de la PCR se resolvió en un gel de agarosa al 1.7% siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.1 de II, en el que se separaron dos bandas: una banda correspondiente al amplificado de la actina murina (310 pb) y otra al amplificado de la actina humana (249 pb). Se consideraron heterocigotos para el transgén aquellos individuos en cuya muestra se observó una mayor intensidad en la banda correspondiente a la actina murina y homocigotos a aquellos individuos en cuya muestra se observó una mayor intensidad en la banda de la actina humana, o una intensidad similar en ambas bandas. Como control de la PCR, de forma rutinaria se añadió a las PCRs DNA humano, DNA de ratón no transgénico y DNA de ratones homocigotos y heterocigotos.

2.1.3 Comprobación del número de repeticiones CTG en los ratones HSA^{LR}

A fin de verificar que los ratones utilizados en este trabajo eran portadores de 250 repeticiones CTG, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de las repeticiones CTG. Para la reacción se añadieron: 2 µl del DNA extraído en el apartado 2.1.1 (100 ng aproximadamente), 10 µl de tampón Flexi GoTaq, 5 µl Mg⁺², 2.5 µl dNTPS (4 mM), 3.8 µl del cebador HSA 10 (4 µM), 3.8 µl del cebador HSA 18 (4 µM), 2.5 µl de DMSO (10 mM), 0.25 µl de la polimerasa Gotaq y H₂O libre de DNAsas hasta un volumen final de

50 µl. El programa utilizado para la amplificación fue: 95°C durante 10 min, 21 ciclos consistentes en 30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 2 min 22 s a 72°C y un último ciclo de 7 minutos a 72°C. El producto de la PCR se resolvió en un gel de agarosa al 0.8% siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.1 de II. El amplicón esperado fue una única banda de 1192 pb correspondientes a 442 pb del amplificado de la actina humana junto con las 250 repeticiones CTG (750 pb).

2.2 Anestesia

Todos los animales, de aproximadamente 20 g de peso, fueron anestesiados mediante una mezcla gaseosa de isoflurano y O₂:N₂O (40:60).

2.3 Administración de compuestos

Con el fin de testar la actividad anti DM1 de la boldina en ratón así como de caracterizar algunas de sus propiedades farmacocinéticas, la boldina fue administrada mediante diferentes vías. A continuación se describen los diferentes protocolos de administración:

Para la administración por vía intramuscular, la inyección de los compuestos se realizó sobre el músculo cuádriceps de las patas posteriores derecha e izquierda utilizando jeringas Hamilton de 1 ml e inyectando un volumen de 10 µl. La administración intramuscular de los compuestos fue llevada a cabo por la Dra. Irma García Alcover.

Durante la administración por vía intraperitoneal, la inyección de los compuestos se realizó en el cuadrante inferior derecho del abdomen del ratón utilizando una aguja de calibre 24 y bisel corto y una jeringa de 1.2 ml, inyectando un volumen de 50 µl.

Para la administración por vía intragástrica se utilizó una sonda oro-esofágica introducida en el esófago del animal (2-3 cm), y una jeringa de 1.2 ml. La administración de los compuestos por las vías intraperitoneal e intragástrica fue llevada a cabo por el personal del estabulario del SCIE (Universidad de Valencia).

La administración por vía intravenosa se realizó mediante una inyección en la vena lateral de la cola utilizando una aguja del calibre 24 y una jeringa de 1.2 ml. Este tipo de administración fue llevado a cabo por el personal asociado al grupo de investigación el Dr. Jose Esteban Peris (Universidad de Valencia).

2.4 Medida de peso

Todos los ratones, de aproximadamente 6 semanas de edad, fueron pesados el día de inicio del tratamiento y el día del sacrificio, previamente a ser anestesiados.

2.5 Eutanasia

Todos los animales incluidos en este estudio fueron sacrificados mediante dislocación cervical inmediatamente después de la punción intracardíaca sin que despertaran de la anestesia. El proceso de eutanasia fue llevado a cabo por la Dra. Irma García Alcover. Se realizó una autopsia visual en la que se determinó la presencia o ausencia de daños macroscópicos en órganos y tejidos.

2.6 Detección de foci ribonucleares en ratones HSA^{LR}

2.6.1 Preparación de la muestra

La disección del músculo cuádriceps de ambas patas traseras se llevó a cabo a 4°C, inmediatamente después de sacrificar a cada animal. La mitad de cada músculo cuádriceps se colocó en moldes de criotomo, se sumergió en OCT y se almacenó a una temperatura de -80°C hasta su procesado. Durante su procesado se obtuvieron secciones de 6µm con el criotomo Leica CM 1510S.

2.6.2 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Secciones de cuádriceps de 6 micras de grosor se fijaron (73% de etanol, 25% de ácido acético y 2% de formaldehído) durante 30 min a 4°C y se prehibridaron durante 10 min con tampón de prehibridación (30% formamida, SSC2X) a temperatura ambiente. La hibridación se realizó en una cámara oscura a 37°C, durante 2 h, utilizando el tampón de hibridación (30% de formamida, SSC 2X, 0.02% de albúmina de suero bobino, tRNA de levadura (1 mg/ml) y 2 mM de metavanadato de sodio) y 2 ng/µl de la sonda marcada Cy3-5' CAGCAGCAGCAGCAGCA^{3'}-Cy3 (Sigma). Tras la hibridación, las muestras se lavaron con el tampón de prehibridación durante 30 minutos a 45°C seguido de un segundo lavado con SSC05X durante 30 min a la misma temperatura. Las muestras se montaron con la solución Vectashield con DAPI.

2.6.3 Análisis de datos

El número de *foci* por núcleo se cuantificó en el microscopio óptico Leica DM2500 utilizando el objetivo de 63 aumentos. Se cuantificó el número de *foci* presentes en 3 campos distintos, en cada uno de los cuales se contaron al menos 25 células. El

número de *foci* obtenido fue dividido entre el número de células contabilizadas. La diferencia entre grupos se analizó utilizando un test t-student de dos colas y $\alpha=0.05$.

2.7 Análisis del procesado alternativo de los transcritos *Serca* y *Cln1* mediante RT-PCR semicuantitativa

2.7.1 Extracción del RNA de músculo

La otra mitad de cada uno de los cuádriceps, obtenidos según se describe en el apartado 2.6.1, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a una temperatura de -80°C . Posteriormente, se extrajo el RNA de los músculos mediante la siguiente metodología: Se homogeneizaron aproximadamente 40 mg de músculo en 1 ml de TriReagent (Sigma). Los homogenados se dejaron durante 5 min a temperatura ambiente antes de añadir 200 μl de cloroformo a cada muestra. La mezcla se agitó y se dejó durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, los tubos se centrifugaron durante 15 min a 12000 g y 4°C . La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo donde se añadieron 500 μl de isopropanol y 3 μg de glicógeno (GlicoBlueTM de Ambion). Tras 10 min a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron de nuevo durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y el pellet se lavó con 1 ml de EtOH al 75%. Tras una nueva centrifugación de 5 min a 7500 g y 4°C se eliminó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente. Una vez seco, éste se resuspendió en agua libre de RNasas previamente calentada a 60°C . La cantidad de RNA obtenido se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectofotómetro (Eppendorf BioPhotometer). Todos los RNAs se diluyeron a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se almacenaron a -80°C .

2.7.2 Tratamiento con DNasa I y retrotranscripción

El DNA genómico presente en las extracciones se eliminó mediante la digestión de 2 μg del RNA con DNasa I (Fermentas), en un volumen total de 8 μl (RNA 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1 μl de tampón 10X de la DNasa, 1.5 μl DNasa y H_2O con un volumen final de 8 μl). La digestión se realizó a 37°C durante 30 min. Posteriormente la DNasa I se inactivó mediante la adición de 1 μl de EDTA 25 mM seguido de 10 min a 65°C . Como molde para la síntesis de cDNA se añadieron a los 8 μl de la digestión con DNasa I 5 μl del Mix 1 (1 μl dNTPs 10 mM, 1 μl hexámeros (Invitrogen) y 5 μl de H_2O). Para desnaturalizar el DNA, los tubos se dejaron a 65°C durante 5 min. Inmediatamente después los tubos se colocaron en hielo y se añadieron 7 μl del Mix 2 (4 μl de tampón Superscript 5X, 2 μl DTT 0.1 M, 1 μl de Inhibidor de RNasa (Invitrogen)) a cada uno. Por último, se añadió 1 μl del enzima retrotranscriptasa SuperscriptTMII (2U; Invitrogen). Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción, la mezcla se calentó a 25°C durante 10 min en un termociclador (Mastercycler Eppendorf), seguido de 50 min a 42°C y 15 min a 70°C . Como controles se hicieron las mismas reacciones bien sin

enzima RT en la mezcla de la reacción o sin RNA molde. El cDNA obtenido se almacenó a una temperatura de -20°C.

2.7.3 Amplificación de los transcritos por PCR

Para la detección de los transcritos *Serca*, *Cln1* y *Gadph* se usó como molde para la reacción de PCR 2 µl del cDNA obtenido en el apartado anterior junto con 0.25 µl de la enzima polimerasa GoTaq (Promega), a los que se añadieron 10 µl de tampón Flexi GoTaq, 3 µl de Mg^{+2} , 1 µl dNTPS (10 mM), 1 µl del cebador directo (*Serca* e21F/ Clc e6F/ *Gadph* F) (10 mM), 1 µl del cebador reverso (*Serca* e23R/ Clc e8R/*Gadph* R)(10 mM) y H₂O libre de DNAsas hasta un volumen final de 50 µl. El programa utilizado para la amplificación fue: 95°C durante 10 min, 25 o 27 ciclos (ver tabla MIII.1.2) consistentes en 30 s a 95°C, 30 s a 58°C, 1 min a 72°C y un último ciclo de 5 min a 72°C.

2.7.4 Análisis de datos

Los productos de las PCRs se resolvieron en un gel de agarosa al 2.5% siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.1 de II. El amplicón esperado en el caso de los transcritos *Serca* fue de dos bandas; una superior de 300 pb y una inferior de 225 pb mientras que el amplicón esperado para los transcritos *Cln1* fue de una banda superior de 450 pb y una banda inferior de 350 pb, en el caso de inclusión del exón 7, y de una banda de 350 pb en el caso de la exclusión del exón 7. La intensidad de las bandas se cuantificó con el programa Image J normalizando los porcentajes de inclusión del exón 22 de *Serca* y de exclusión del exón 7a del gen *Cln1* con los valores del gen *Gadph*. Las diferencias entre grupos se analizaron usando un test t-student de dos colas y $\alpha=0.05$.

2.8 Medida de la miotonía por electromiografía (EMG)

Para la medida de la miotonía mediante electromiografía, el electromiograma fue realizado siempre con el animal anestesiado a fin de mantenerlo inmovilizado. Las mediciones se realizaron con un electrodo tipo aguja concéntrica de 30 G utilizando el electromiógrafo TECA TD-20 MK II EMG/EP. Se llevaron a cabo 10 medidas en el cuádriceps de ambas patas de cada individuo. Las descargas miotónicas fueron clasificadas según la siguiente escala: 0, no miotonía; 1, descargas miotónicas en menos del 50% de las inserciones; 2, descargas miotónicas en más del 50% de las inserciones y 3, descargas miotónicas en prácticamente todas las inserciones (Mankodi *et al.*, 2000).

2.9 Medida del tiempo de respuesta de reposicionamiento (TRR) en un modelo de miotonía inducida químicamente en ratón

2.9.1 Administración de los compuestos

Cada día de ensayo se preparó una solución de 2.4 g/l de ácido antraceno-9-carboxílico (9-AC)(Sigma), agua de inyección y 0.3% de bicarbonato. A cada ratón incluido en el estudio se le administró por vía intraperitoneal el volumen de la solución necesario para obtener una concentración de 9-AC de 60 mg/kg siguiendo los previamente publicado en Desaphy *et al.*, 2013. Los compuestos boldina y mexiletine (ambos de Sigma) fueron previamente disueltos directamente en suero salino y administrados por vía intragástrica a una concentración de 10 mg/kg.

2.9.2 Medida del TRR

Al inicio del experimento los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 9-AC. Transcurridos 10 min, se les administraron los compuestos boldina o mexiletine por vía intragástrica. El TRR se midió y cuantificó como el tiempo que tarda un ratón en darse la vuelta sobre sus cuatro patas tras ser colocado en una posición supina. Para cada ratón se determinó el TRR a los 10 min anteriores y a los 30, 60, 120 y 180 min posteriores a la administración del 9-AC. En cada tiempo, el TRR se calculó como la media de 10 medidas realizadas con un intervalo de un minuto entre medida. Las diferencias entre grupos se calcularon mediante el análisis de varianza ANOVA de una vía seguido del test t de student no pareado.

2.10 Cuantificación de la boldina en sangre y tejidos de ratón

Se emplearon ratones macho CD-1, con un peso aproximado de 25 g. A cada animal se le administró una dosis de 0.5 mg de boldina previamente disuelta en suero salino (aproximadamente a una concentración de 20 mg/kg) por vía intravenosa. Los animales se sacrificaron, mediante punción cardíaca previa anestesia con isoflurano, a tiempos prefijados y se procedió a la extracción de cerebro y músculo esquelético. La sangre obtenida mediante punción cardíaca se depositó en un tubo con heparina y se centrifugó para obtener el plasma sobrenadante, que se mantuvo a -18°C hasta el momento de la determinación analítica. Los tejidos se congelaron inmediatamente (-18°C). Los tiempos de muestreo fueron: 5, 10, 20, 30 y 45 min. Por cada tiempo de muestreo se emplearon 3 ratones. La determinación de la concentración de boldina en las muestras de plasma y en los tejidos se efectuó mediante cromatografía líquido-líquido de alta eficacia (HPLC) con detección fluorimétrica según se describe en el artículo de Melis *et al.*, (2012). Brevemente, los tejidos se homogeneizaron con suero salino como parte de su procesado para la determinación analítica. Para la separación por cromatografía se utilizó una columna Waters Nova Pack C-18 (3.9 mm × 150 mm, 4

_m) y para la detección fluorimétrica se utilizó un detector programable HP 1046 programado a 260 nm (excitación) y 310 nm (emisión). La cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo/H₂O (80:20 v/v). El caudal fue de 1 ml/min y el volumen de inyección fue de 25 μ l. Para la cuantificación de las concentraciones plasmáticas y las concentraciones en los tejidos se utilizaron patrones de boldina preparados en plasma y tejidos, respectivamente.

IV. Experimentos en cultivo celular

1. Materiales

1.1 Líneas celulares empleadas IV

1.1.1 Líneas celulares modelo de DM1

Para aquellos experimentos en modelos celulares de DM1 se utilizaron fibroblastos transdiferenciados en mioblastos por expresión inducible de MyoD. Estos fibroblastos fueron procedentes de pacientes con DM1 o de individuos sanos (control) y fueron cedidos por el Dr. López de Munain (Instituto Biodonostia, País Vasco).

Las diferentes líneas utilizadas fueron:

MIV.1 .1.1 Líneas celulares modelo de DM1 utilizadas	
Referencia identificativa	Número de repeticiones CTG*
9.56	1333 repeticiones (DM1)
9.73	333 repeticiones (DM1)
9.99	1000 repeticiones (DM1)
9.88	<50 repeticiones (control no DM1)

* El número de repeticiones CTG en el gen *DMPK* fue determinado por *southern blot* a partir de muestras sanguíneas por la Dra. Amets Sáenz Peña).

Todas las líneas celulares anteriormente descritas fueron crecidas en medio de proliferación de fibroblastos: DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), penicilina (50 IU/ml) y estreptomina (50 μ g/ml) (Invitrogen). Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador humidificado con CO₂ al 5%.

1.1.2 Otras líneas celulares

A lo largo de este trabajo se utilizaron otras líneas celulares no vinculadas con la DM1:

MIV.1 .1.2 Otras líneas celulares utilizadas	
Nombre	Origen
<i>Células cromafines de la glándula adrenal bovina</i>	Instituto Teófilo Hernando
<i>HEK293</i>	Fundación MEDINA
<i>Caco-2</i>	CEREP
<i>Microsomas hepáticos humanos</i>	Fundación MEDINA

1.2 Cebadores IV

Para llevar a cabo las reacciones de PCR relacionadas con los experimentos de cultivo celular, se utilizaron los siguientes cebadores:

MIV.1.2 Cebadores utilizados para los ensayos en cultivo celular		
Nombre	Secuencia	Ta y Ciclos
SERCA R	GATGATCTTC AAGCTCCGGGC	58°C, 25 ciclos
SERCA F	CAGCTCTGCCTGA AGATGTG	
INSR F	CCAAAGA CAGACTCTCAGAT	55°C, 35 ciclos
INSR R	CAGCTCTGCCTGA AGATGTG	
cTNT F	GTCTCAGC CTCTGCTTCAGCATCC	55°C, 29 ciclos
cTNT R	ATAGAA GAGGTGGTGGAAAGAGTAC	
GAPDH F	GTTACACCCCATGACGAACAT	55°C, 27 ciclos
GAPDH R	CATCTTCCAGGAGCGAGATC	
DMPK F	GCTAGTGAAGATGAAGCAGACGG	
DMPK R	GGAAGCACGACACCTCGC	
MBNL F	TGCACAGAAATTAATGCGAACA	
MBNL R	AATCATTTTCTCCTCGGTTGC	

1.3 Kits IV

CellTiter 96® AQueous Solution Cell Proliferation Assay (Promega)

RNAGEM™ Tissue Plus kit (Zygem)

Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories)

FluxOR™ Potassium Ion Channel Assay (Invitrogen)

SYBR® Green PCR Master Mix and SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit (Applied Biosystems)

2. Métodos

2.1 Ensayo de citotoxicidad

Las células fueron sembradas a una densidad de $5 \cdot 10^3$ en placas de 96 pocillos con fondo plano en medio de proliferación de fibroblastos. Tras 24 h, se añadieron diluciones seriadas de boldina en un volumen de 50 μ l. Transcurridos 3 días, se añadió a las células el reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Transcurridas 2 h, se midió la absorbancia a 490 nm con el lector de placas Envision (Perkin Elmer) y se calculó el IC₅₀ utilizando la media de cuatro réplicas. Cada ensayo se repitió por triplicado.

2.2 Detección de foci ribonucleares

2.2.1 Preparación de la muestra

Se sembraron fibroblastos de las líneas celulares 9.73 y 9.88 en placas de 24 pocillos en los que previamente se colocó un cubreobjetos. A fin de que los fibroblastos se fijaran en el cubreobjetos, se dejaron en la placa durante 24 h. Transcurrido este tiempo se añadieron los compuestos a ensayar y se dejaron actuar durante otras 24 h. Posteriormente las células se fijaron durante 15 min con PFA 4% a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS 1X y se conservaron en EtOH 70% a una temperatura de 4°C hasta el momento de su procesado. Las células 9.73 fueron tratadas con boldina 100 μ M o con 1% de DMSO mientras que las células 9.88, provenientes de individuos sanos, se trataron con 1% de DMSO.

2.2.2 Hibridación in situ fluorescente (FISH)

Las células fueron rehidratadas con PBS 1X y prehibridadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con el tampón de prehibridación (40% de formamida desionizada, 2X SSC). La hibridación se realizó en una cámara oscura a 37°C usando el tampón de hibridación (30% de formamida, 2X SSC, 0.02% BSA, 1 mg/ml de tRNA de levadura (Sigma), 2 mM de metavanadato de sodio, 1 m/ml de DNA de esperma de arenque desnaturalizado, 10% de sulfato dextrano y 1 ng/ μ l de la sonda de RNA Cy3-5' CAGCAGCAGCAGCAGCA^{3'}-Cy3 (Sigma)). Tras la hibridación las células fueron lavadas con el tampón de prehibridación durante 15 min a 45°C (dos lavados) y una vez con PBS 1X a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron con la solución Vectashield con DAPI.

2.2.3 Análisis de datos

El número de *foci* por núcleo celular se cuantificó en el microscopio óptico Leica DM2500 utilizando el objetivo de 63 aumentos. Se cuantificó el número de *foci*

presentes en 3 campos distintos, en cada uno de los cuales se contaron 25 células. El número de *foci* obtenido fue dividido entre el número de células observadas y se analizó utilizando un test t-student de dos colas y $\alpha=0.05$.

2.3 Cuantificación de la distribución de MBNL1 mediante inmunodetección

2.3.1 Preparación de la muestra

Se sembraron células de las líneas 9.56 y 9.88 a una densidad de 10^5 cels/ml en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos circulares de 12 mm con medio de proliferación de fibroblastos. Transcurridas 24 h se sustituyó el medio de proliferación de fibroblastos por medio de transdiferenciación en mioblastos (DMEM suplementado con 2% de suero de caballo, penicilina (50 IU/ml), estreptomycin (50 μ g/ml), 100 μ g/ml de apotransferrina, 10 μ g/ml de insulina y 2 μ g/ml de doxiciclina) con un volumen final de 500 μ l por pocillo. Tras 24 h de incubación se añadieron los compuestos a ensayar y se dejaron actuar durante 2 h. Las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se fijaron durante 15 minutos con PFA 4% a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS 1X durante 5 min y se conservaron en PBS 1X a 4°C durante toda la noche. Las células 9.56 fueron tratadas con boldina 100 μ M o con 1% de DMSO. Las células 9.88 provenientes de individuos sanos se trataron con 1% de DMSO. Todo el proceso se llevó a cabo en una cámara húmeda y en oscuridad.

2.3.2 Inmunohistoquímica

Las muestras se lavaron con PBST (Tritón X 0.3%) durante 5 min (2 lavados) tras los que se añadieron 300 μ l de solución de bloqueo (suero de burro 1% en PBST) durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se añadió el primer anticuerpo; 300 μ l de anti-MBNL1 (Sigma) diluido 1:100 en solución de bloqueo. El anticuerpo se dejó en incubación durante una noche a 4°C. Tras 3 lavados con PBST de 5 min de duración se añadió a cada muestra el segundo anticuerpo; 300 μ l de anti-mouse-biotinilado (Fisher Scientific) disuelto 1:200 en solución de bloqueo durante 45 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo las muestras fueron lavadas durante 5 min con PBST (3 lavados). Para la amplificación de la señal se añadieron a cada muestra 300 μ l del reactivo AB del Vectastain Elite ABC kit (proporción 40A:40B:920 PBST, preparado al menos 30 minutos antes de usar) y se dejó en incubación durante 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron lavadas durante 5 min con PBST (3 lavados). Finalmente se añadieron 300 μ l de Avidina Alexa Fluor 488 (Fisher Scientific) en proporción 1:200 en PBST a cada muestra y se dejó en incubación durante 45 min a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBS de 5 min de duración, las muestras fueron montadas con vestashield con DAPI.

2.3.3 Análisis de imágenes

Las imágenes fueron tomadas mediante el uso de un microscopio confocal Olympus FluoView FV100 (SCIE) ajustando las condiciones del canal azul para el DNA y del canal verde para MBNL1. Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ.

2.4 Análisis del splicing de transcritos por RT-PCR semicuantitativa

2.4.1 Administración del compuesto

Las células se sembraron en placas petri de 60 mm, a una densidad de 125.000 cels/placa, poniendo 3 ml de células en cada pocillo. Se dejaron transcurrir 24 h para que los fibroblastos se fijasen, y se cambió el medio de proliferación de fibroblastos por medio de transdiferenciación en mioblastos (descrito en el apartado 2.3.1 de IV). Transcurridas 24 h desde el cambio de medio, se añadieron los compuestos a la concentración deseada y se dejaron actuar durante 24 h. Pasado este tiempo las células se lavaron con PBS 1X y se recogieron con un raspador.

2.4.2 Extracción de RNA total

A partir de las células recogidas en el apartado anterior, se extrajo el RNA con el kit RNAGEN™ Tissue Plus (Zygem) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 8 µl del RNA obtenido como molde para la retrotranscripción siguiendo los pasos descritos en el apartado 2.7.2 de III.

2.4.3 Amplificación de los transcritos por PCR

Para las PCRs de *cTNT*, *SERCA*, *INSR* y *GAPDH* se utilizó 1 µl del cDNA obtenido como molde junto con 10 µl de tampón Flexi Gotag, 3 µl de Mg⁺², 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl de cebador directo (cTNT F/SERCA F/ INSR F/ GAPDH F) (10 mM), 1 µl de cebador reverso (cTNT R/SERCA R/ INSR R/ GAPDH R) (10 mM), 0.25 µl de la polimerasa GoTaq y H₂O libre de DNAsas hasta alcanzar un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron las estándar, con una temperatura de hibridación y un número de ciclos específicos para cada gen (ver tabla MIV.1.2)

2.4.4 Análisis de datos

Los productos de las PCRs se separaron en un gel de agarosa al 2.5%. El amplicón esperado en todos los casos fue de dos bandas de diferente tamaño: 244 pb y 201 pb en *SERCA*, 132 pb y 110 pb en *cTNT* y 165 pb y 129 pb en el caso de *INSR*. La intensidad de las bandas se cuantificó con el programa Image J para obtener los porcentajes de inclusión del exón 22 de *SERCA*, del exón 5 de *cTNR* y del exón 11 de *INSR* normalizando con los valores del gen *GAPDH*. Las diferencias entre grupos se analizaron usando un test t-student de dos colas y $\alpha=0.05$.

2.5 Determinación de los niveles expresión de MBNL1 y DMPK mediante qRT-PCR

Tras la administración de los compuestos y la extracción del RNA total descritos en el apartado 2.4 de IV, los cebadores DMPK F/DMPK R/ MBNL1 F/MBNL1 R se mezclaron con las muestras de cDNA y el Master Mix del kit Power SYBR Green PCR (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación en tiempo real y la posterior cuantificación se llevaron a cabo mediante el uso del Step One Plus (Applied Biosystems) (SCIE) siguiendo el protocolo del fabricante.

2.6 Estudios electrofisiológicos de diferentes canales de membrana.

2.6.1 Preparación y cultivo de las células cromafines de la glándula adrenal bovina

Las células cromafines bovinas fueron aisladas siguiendo un protocolo estándar (Licett, 1984) modificado según Moro *et al.*, (1990). Las células se suspendieron en medio Dulbecco MEM (DMEM) suplementado con 7.5% de suero bovino fetal, 10 μ M de citosina arabinosa, 10 μ M de fluorodeoxiuridina, 50 IU/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomycin. Para la medida de las corrientes iónicas, las células se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos circulares de 1 cm de diámetro con una densidad de 10^5 células por pocillo.

2.6.2 Estudios electrofisiológicos

Las corrientes de entrada a la célula a través de canales de sodio (I_{Na}) dependientes de voltaje, de canales de calcio (I_{Ca} ; I_{Ba}) voltaje dependientes, y a través de receptores nicotínicos neurales (AChR), así como las corrientes de salida a través de canales de potasio (I_{K}) en células cromafines bovinas se registraron mediante la técnica *patch-clamp* en su variante de célula completa (Hamill *et al.*, 1981).

Durante la preparación del proceso de sellado de la membrana celular, la cámara contuvo una solución control Tyrode compuesta por NaCl 137 mM, KCl 5.3 mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 10 mM pH 7.4. Una vez rota la membrana y formado el "gigasello", con la configuración de célula completa de la técnica *patch-clamp* bien establecida, la célula se perfundió rápidamente con una solución extracelular de composición similar a la solución de la cámara, modificada según la corriente a registrar: 0 mM de Ca⁺² para la medida de I_{Na} , 10 mM de Ca⁺² para la medida de I_{Ca} , y 10 mM de Ba⁺² para la medida de I_{Ba} .

Para el registro de corrientes iónicas de entrada, las células se dializaron con una solución intracelular formada por CsCl 100 mM, EGTA 14 mM, TEA.Cl 20 mM, NaCl 10

mM, Mg-ATP 5 mM, Na-GTP 0.3 mM y HEPES/CsOH 20 mM pH 7.3. Durante el registro de las corrientes de salida a través de canales potásicos, las células fueron internamente dializadas con una solución compuesta por KCl 140 mM, EGTA 14 mM, NaCl 10 mM, Mg-ATP 5 mM, Na-GTP 0.3 mM y HEPES/CsOH 20 mM pH 7.3. Estos experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

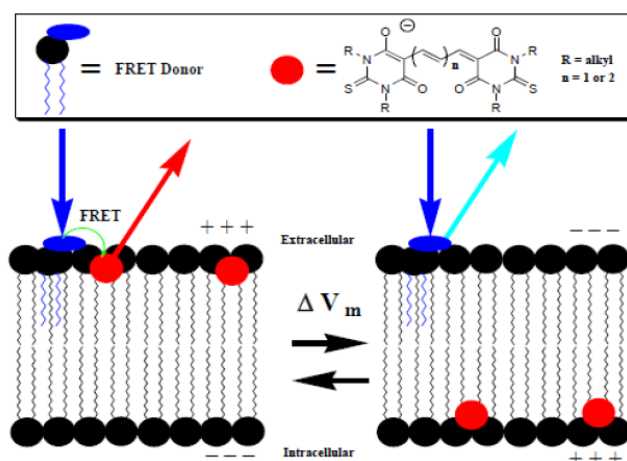
El registro de las corrientes se llevó a cabo mediante un amplificador EP-10 (HEKA Electronic) con electrodos de resistencia 2-5 M Ω . Los datos se adquirieron a una frecuencia de entre 5 y 10 kHz y posteriormente se filtraron a una frecuencia de 1 u 2 kHz. Se descartaron aquellos datos de corrientes débiles (> 25 pA) o de resistencias en serie >20 Ω . El análisis de datos se llevó a cabo con programas PULSO (Heka Elektronik) e Igor Pro (Wavemetrics).

2.7 Estudios de seguridad cardíaca

2.7.1 Canal de sodio Nav1.5

Para la medición del estado del canal de sodio Nav1.5 se utilizó un ensayo funcional basado en la tecnología FRET (del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (Figura M1) (Felix *et al.*, 2004) (Huang *et al.*, 2006).

Figura M1. Fundamento del ensayo funcional del canal Nav1.5. El fluorocromo donador (CC2-DMPE) se une a la parte exterior de la membrana plasmática. El aceptor (Oxonol) está cargado negativamente, y es móvil, por lo que puede unirse a ambas partes de la membrana plasmática según sea el potencial de membrana. En el momento de la excitación del CC2-



DMPE, el fluorocromo genera una señal que podrá excitar al Oxonol si ambas sondas están suficientemente próximas, situación que se da cuando la membrana está en el potencial de reposo. Cuando la membrana se despolariza (debido a la entrada de iones Na^+), el Oxonol pasa a la cara interna de la membrana rompiendo así la transferencia de energía y provocando que solo se detecte la señal CC2-DMPE.

Para realizar el ensayo, células HEK293 transformadas que expresan el canal Nav1.5 se sembraron en placas opacas de 96 pocillos tratadas con poli-D-lisina y se incubaron durante 24 h. Tras este tiempo, el medio fue eliminado manualmente y las placas se

lavarón con 100 μ l de tampón VIPR_PBS (PBS, glucosa 10 mM, HEPES/NaOH 10 mM, pH 7.2). A continuación se añadió el primer fluorocromo (*CC2-DMPE* 5 μ M) disuelto en VIPR_PBS y se dejó en incubación durante 45 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la eliminación del primer fluorocromo de forma manual las placas se lavarón con tampón VIPR-salino (NaCl 165 mM, KCl 4.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes/NaOH 10 mM, glucosa 10 mM, pH 7.2) y se añadió el segundo fluorocromo (5 μ M *oxonol* (*DisBac2*) disuelto en VIPR-salino junto con los compuestos preparados en DMSO (0.5%) a una dilución de 1:200 (2 μ l de compuesto/400 μ l oxonol 10 μ M) utilizando una estación Biomek (Beckman Coulter). Las células permanecieron en incubación durante 45 min a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación las placas fueron leídas en una estación FLIPRTETRA/VIPR II™, que añadió veratratina (una neurotoxina que abre los canales de sodio) a 25 μ M, leyendo de manera continua durante 50 s. En condiciones de despolarización, la boldina se testó a la máxima concentración (50 μ M) (12 puntos, dilución 1:2) por triplicado y se calculó la IC₅₀. En condiciones de reposo, la boldina se testó a 50 y 12.5 μ M por triplicado. A cada placa se añadió un control positivo (riluzole 2 μ M) y un control negativo (DMSO 0.5%).

2.7.2 Canal de calcio Cav1.2

Para realizar este ensayo se utilizaron células HEK293 que expresan, además del canal Cav1.2, el canal de K⁺ Kir 2.3, lo que permite controlar el potencial de membrana mediante concentraciones de K⁺. El flujo de calcio se midió en un FLIPR (Molecular devices, Sunnyvale, CA). Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos negras con fondo claro tratadas con poli-D-lisina a una densidad de 140.000 células/pocillo y se dejaron una noche en incubación. Posteriormente las células se incubaron con 4 μ M de la sonda Fluo-4AM (Molecular Probes) en el tampón del ensayo en condiciones de reposo (146.2 mM NaCl, 5.8 mM KCl, 0.005 mM CaCl₂, 1.7 mM MgCl₂, 10 HEPES, pH= 7.2) durante 30 min a 37°C en una atmósfera con el 5% CO₂ y 95% de aire.

En el ensayo en condiciones de reposo, las células se lavarón dos veces con K⁺ 5.8 mM y se incubaron junto con la boldina en el tampón de ensayo anteriormente descrito. La señal de fluorescencia emitida por el Fluo-4 unido al calcio citosólico fue registrada por un FLIPR, indicando en cada pocillo los cambios en la concentración intracelular de Ca²⁺, 60 segundos después de la adición de K⁺ 85.5 mM.

En el ensayo en condiciones de despolarización, las células junto con la boldina se incubaron en tampón con 127 mM NaCl, 25 mM KCl, 0.005 mM CaCl₂, 1.7 mM MgCl₂, 10 HEPES, pH= 7.2. Posteriormente se siguió la misma metodología descrita para las condiciones de reposo.

La boldina se preparó en DMSO y se añadió a las placas de ensayo a una dilución 1:200 (2 μ l de compuesto/400 μ l de tampón) utilizando una estación Biomek. En condiciones de reposo la boldina se testó a 50 y 12.5 μ M (12 puntos) por triplicado y se calculó la

IC₅₀ mientras que en condiciones de despolarización, la boldina se testó a 50 µM (12 puntos) por triplicado.

2.7.3 Canal de potasio hERG

Como fuente de canal de potasio hERG se utilizaron membranas purificadas de células HEK293 transformadas, ya que tienen una alta expresión de hERG. Para caracterizar el comportamiento del canal de potasio hERG en presencia de boldina se utilizó un ensayo funcional basado en la utilización de una sonda fluorescente (FluxORTM, Invitrogen) que emite fluorescencia tras su unión a iones talio (Beacham *et al.* 2010). El FluxORTM está protegido por grupos AM que impiden la fluorescencia fuera de la célula. Cuando entra en la célula, las esterasas del citosol eliminan los grupos AM, y el FluxORTM pasa a su forma activa en la que es capaz de unir el talio, que pasa al citoplasma a través del canal hERG, resultando en la emisión de fluorescencia.

El ensayo FluxORTM se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante en un FLIPR TETRA (Molecular Devices). Las células HEK293 se sembraron en placas negras de 96 pocillos tratadas con poli-D-lisina y se dejaron incubando durante 24 h. Después de este tiempo, las placas fueron lavadas con tampón de ensayo (NaCl 165 mM, KCl 4.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 10 mM y glucosa 10 mM, pH 7.4). A continuación se añadieron 80 µl de FluxORTM disuelto en tampón de ensayo. El fluorocromo se dejó incubando con las células durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación las placas se lavaron con 100 µl de tampón de ensayo y se añadió la boldina a una dilución 1:200 (2 µl de compuesto / 400 µl de tampón de ensayo) utilizando una estación BiomekFXTM. De la mezcla, 100 µl fueron pipeteados a 3 placas de células, estando el compuesto ensayado por triplicado a una concentración máxima de 50 µM. Las placas fueron incubadas durante 30 min y a continuación se leyeron en un FLIPRTETRA, el cual añadió 20 µl de tampón de estímulo (TI2SO4 + K2SO4), y realizó la lectura de la fluorescencia durante 120 s permitiendo analizar la cinética del canal. A partir de las diferentes réplicas se calculó la IC₅₀ para la boldina.

2.8 Estudios de absorción *in vitro*; ensayo de permeabilidad A-B

Tanto para el estudio de permeabilidad en dirección Apical-Basal como en dirección Basal-Apical, células Caco 2 se incubaron junto con Boldina durante 0 y 60 minutos a 37°C según se describe en Hidalgo *et al.*, (1989). En ambos ensayos, el pH a ambos lados de la membrana fue de 7.4. La boldina se testó a 10 µM y 1% de DMSO. Tras el periodo de incubación, la cantidad de compuesto a cada lado de la monocapa se determinó por HPLC-MS/MS según condiciones estándar.

El Coeficiente de Permeabilidad Aparente (P_{app}) de la boldina se calculó según la siguiente fórmula:

$$P_{app} \text{ (cm/s)} = \frac{VR * CR_{end}}{\Delta t} * \frac{1}{A * (CD_{mid} - CR_{mid})}$$

donde VR es el volumen en la cámara receptora, CR_{end} es la concentración del compuesto testado en la cámara receptora en el momento final del ensayo, Δt es el tiempo de incubación y A es el área de la monocapa celular. CD_{mid} es la media de la concentración del compuesto en la cámara aceptora a tiempo 0 y al final del ensayo mientras que CR_{mid} es la media de la concentración del compuesto en la cámara receptora a tiempo 0 y al final del ensayo.

El porcentaje de recuperación de la boldina a ambos lados de la monocapa se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{VD * CD_{end} + VR * CR_{end}}{VD * CD_0} * 100$$

donde VD y VR son los volúmenes de las muestras aceptora y receptora, CD_{end} es la concentración del compuesto testado en la muestra dadora en el momento final del ensayo y CR_{end} es la concentración del compuesto testado en la muestra receptora en el momento final del ensayo.

Antes de cada ensayo se determinó la integridad de la monocapa celular mediante el cálculo de la permeabilidad A-B de la fluoresceína. Se consideraron óptimas para el ensayo aquellas monocapas con una permeabilidad para la fluoresceína inferior a 1.5×10^6 cm/s.

2.9 Estudios de metabolismo; ensayo de inhibición del citocromo P450

Como fuente de enzimas con sustratos similares a moléculas aptas para ser un fármaco se utilizaron microsomas hepáticos humanos, que se incubaron junto con boldina durante un rango lineal de 15 minutos. Como sustrato se utilizó testosterona 50 μ M. Las reacciones enzimáticas se monitorizaron mediante cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas siguiendo las condiciones estándar. La boldina se disolvió a 25 mM en DMSO. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en AcN con un factor de dilución igual a 2, obteniendo así 10 concentraciones diferentes. La concentración final de solventes orgánicos en las diferentes diluciones fue de 0.35% DMSO, 0.65% AcN y 86.2 μ M del compuesto.

Según los criterios generales de clasificación los compuestos se categorizaron en los siguientes grupos:

Tabla M1. Clasificación del potencial de inhibición de P450 de un compuesto según su IC_{50}

Potencial de Inhibición	IC_{50}
<i>Alto</i>	$IC_{50} < 1 \mu M$
<i>Medio</i>	$1 \mu M < IC_{50} < 10 \mu M$
<i>Bajo</i>	$IC_{50} > 10 \mu M$

Bibliografía

Bibliografía

- Adereth, Y., Dammai, V., Kose, N., Li, R., & Hsu, T. (2005). RNA-dependent integrin alpha3 protein localization regulated by the muscleblind-like protein MLP1. *Nat Cell Biol*, 7(12), 1240-7.
- Almeida, E. R., Melo, A. M., & Xavier, H. (2000). Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of peumus boldus and boldine in rats.. *Phytotherapy Research*, 14, 99-102.
- Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M. G., & Brook, J. D. (1999). Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet*, 8(8), 1491-7.
- Ambros, V. (2001). microRNAs: Tiny regulators with great potential. *Cell*, 107(7), 823-6.
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., et al. (1998). The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of drosophila muscles and is regulated by Dmef2. *Dev Biol*, 195(2), 131-43.
- Artursson, P., & Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175, 880-885.
- Balani, S. K., Miwa, G. T., Gan, L. S., Wu, J. T., & Lee, F. W. (2005). Strategy of utilizing in vitro and in vivo ADME tools for lead optimization and drug candidate selection. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5, 1033-1038.
- Barreau, C., Paillard, L., Méreau, A., & Osborne, H. (2006). Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: Molecular characteristics and biological functions. *Biochimie*, 88, 515-525.
- Beacham, D. W., Blackmer, T., O' Grady, M., & Hanson, G. T. (2010). Cell-based potassium ion channel screening using the FluxOR assay. *Journal of Biomolecular Screening*, 15, 441-446.
- Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Perez-Alonso, M., & Mlodzik, M. (1997). Muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in drosophila, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development*, 124(21), 4321-31.
- Behrens, M. I., Jalil, P., Serani, A., Vergara, F., & Alvarez, O. (1994). Possible role of apamin-sensitive K⁺ channels in myotonic dystrophy. *Muscle & Nerve*, 17, 1264.
- Bilen, J., & Bonini, N. M. (2005). Drosophila as a model for human neurodegenerative disease. *Annual Review of Genetics*, 39(153), 171.
- Blech-Hermoni, Y., Stillwagon, S. J., & Ladd, A. N. (2013). Diversity and conservation of CELF1 and CELF2 RNA and protein expression patterns during embryonic

- development. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 242, 767-777.
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401-15.
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., et al. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 68(4), 799-808.
- Brouwer, J. R., Huguet, A., Nicole, A., Munnich, A., & Gourdon, G. (2013). Transcriptionally repressive chromatin remodelling and CpG methylation in the presence of expanded CTG-repeats at the DM1 locus. *Journal of Nucleic Acids*, 2013, 567435.
- Bryant, S. H., & Morales-Aguilera, A. (1971). Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibres and the action of monocarboxylic aromatic acids. *The Journal of Physiology*, 219, 367-383.
- Buj-Bello, A., Furling, D., Tronchere, H., Laporte, J., Lerouge, T., Butler-Browne, G. S., et al. (2002). Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. *Hum Mol Genet*, 11(19), 2297-307.
- Caillet-Boudin, M. L., Fernandez-Gomez, F. J., Tran, H., Dhaenens, C. M., Buee, L., & Sergeant, N. (2014). Brain pathology in myotonic dystrophy: When tauopathy meets spliceopathy and RNAopathy. *Front Mol Neurosci*, 6, 57.
- Caso, F., Agosta, F., Peric, S., Rakočević-Stojanović, V., Copetti, M., Kostic, V. S., et al. (2014). Cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1 is associated with white matter damage. *PLoS One*, 9, e104697.
- Chamberlain, C. M., & Ranum, L. P. (2012). Mouse model of muscleblind-like 1 overexpression: Skeletal muscle effects and therapeutic promise. *Human Molecular Genetics*, 21, 4645-4654.
- Chang, S., Bray, S. M., Li, Z., Zarnescu, D. C., He, C., Jin, P., et al. (2008). Identification of small molecules rescuing fragile X syndrome phenotypes in drosophila. *Nature Chemical Biology*, 4, 256-263.
- Charizanis, K., Lee, K. Y., Batra, R., Goodwin, M., Zhang, C., Yuan, Y., et al. (2012). Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron*, 75, 437-450.
- Charlet, B. N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., & Cooper, T. A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell*, 10(1), 45-53.
- Chau, A., & Kalsotra, A. (2014). Developmental insights into the pathology of and therapeutic strategies for DM1: Back to the basics. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 244, 377-390.

- Cheng, A. W., Shi, J., Wong, P., Luo, K. L., Trepman, P., Wang, E. T., et al. (2014). Muscleblind-like 1 (Mbnl1) regulates pre-mRNA alternative splicing during terminal erythropoiesis. *Blood*, *124*(4), 598-610.
- Childs-Disney, J. L., Stepniak-Konieczna, E., Tran, T., Yildirim, I., Park, H., Chen, C. Z., et al. (2013). Induction and reversal of myotonic dystrophy type 1 pre-mRNA splicing defects by small molecules. *Nat Commun*, *4*, 2044.
- Childs-Disney, J. L., Wu, M., Pushechnikov, A., Aminova, O., & Disney, M. D. (2007). A small molecule microarray platform to select RNA internal loop-ligand interactions. *ACS Chem Biol*, *2*(11), 745-54.
- Coleman, S. M., Prescott, A. R., & Sleeman, J. E. (2014). Transcriptionally correlated subcellular dynamics of MBNL1 during lens development and their implication for the molecular pathology of myotonic dystrophy type 1. *Biochem J*, *458*(2), 267-80.
- Conte-Camerino, D., Tricarico, D., & Desaphy, J. F. (2007). Ion channel pharmacology. *Neurotherapeutics*, *4*, 184-198.
- Coonrod, L. A., Nakamori, M., Wang, W., Carrell, S., Hilton, C. L., Bodner, M. J., et al. (2013). Reducing levels of toxic RNA with small molecules. *ACS Chemical Biology*, *8*, 2528-2537.
- Dansithong, W., Jog, S. P., Paul, S., Mohammadzadeh, R., Tring, S., Kwok, Y., et al. (2011). RNA steady-state defects in myotonic dystrophy are linked to nuclear exclusion of SHARP. *EMBO Rep*, *12*(7), 735-42.
- Daughters, R. S., Tuttle, D. L., Gao, W., Ikeda, Y., Moseley, M. L., Ebner, T. J., et al. (2009). RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. *PLoS Genet*, *5*(8), e1000600.
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N. A., et al. (2006). MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a drosophila model of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*, *15*(13), 2138-45.
- Desaphy, J. F., Costanza, T., Carbonara, R., & Conte-Camerino, D. (2013). In vivo evaluation of antimyotonic efficacy of β -adrenergic drugs in a rat model of myotonia. *Neuropharmacology*, *65*, 21-27.
- Du, J., Aleff, R. A., Soragni, E., Kalari, K., Nie, J., Tang, X., et al. (2015). RNA toxicity and missplicing in the common eye disease fuchs endothelial corneal dystrophy. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*, 5979-5990.
- Du, H., Cline, M. S., Osborne, R. J., Tuttle, D. L., Clark, T. A., Donohue, J. P., et al. (2010). Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol*, *17*(2), 187-93.
- Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidse, K., & Junghans, R. P. (2004). RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science*, *303*(5656), 383-7.
- Eltze, M., Grebe, T., Michel, M. C., Czyborra, P., & Ullrich, B. (2002). Affinity profile at alpha(1)- and alpha(2)-adrenoceptor subtypes and in vitro cardiovascular actions of (+)-boldine. *European Journal of Pharmacology*, *443*, 151-168.

- Estévez, R., Schroeder, B. C., Accardi, A., Jentsch, T. J., & Pusch, M. (2003). Conservation of chloride channel structure revealed by an inhibitor binding site in ClC-1. *Neuron*, *38*, 47.
- Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S., et al. (2002). Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet*, *11*(7), 805-14.
- Felix, J. P., Williams, B. S., Priest, B. T., Brochu, R. M., Dick, I. E., Warren, V. A., et al. (2004). Functional assay of voltage-gated sodium channels using membrane potential-sensitive dyes. *Assay and Drug Development Technologies*, *2*, 260-268.
- Foff, E. P., & Mahadevan, M. S. (2011). Therapeutics development in myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve*, *44*(2), 160-9.
- Franke, C., Hatt, H., Iazzo, P. A., & Lehmann-Horn, F. (1990). Characteristics of Na⁺ channels and Cl⁻ conductance in resealed muscle fibre segments from patients with myotonic dystrophy. *The Journal of General Physiology*, *425*, 431.
- Frisch, R., Singleton, K. R., Moses, P. A., Gonzalez, I. L., Carango, P., Marks, H. G., et al. (2001). Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy. *Mol Genet Metab*, *74*(1-2), 281-91.
- Fugier, C., Klein, A. F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., et al. (2011). Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med*, *17*(6), 720-5.
- Gagnon, C., Noreau, L., Moxley, R. T., Laberge, L., Jean, S., Richer, L., et al. (2007). Towards an integrative approach to the management of myotonic dystrophy type 1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *78*(8), 800-6.
- Galbis, J. (2004). *Panorama actual de la química farmacéutica* (2ª ed.). Sevilla: Universidad de Sevilla, Secretariado de publicaciones.
- Gambardella, S., Rinaldi, F., Lepore, S. M., Viola, A., Loro, E., Angelini, C., et al. (2010). Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Transl Med*, *8*, 48.
- García-Alcover, I. (2014). Descubrimiento y caracterización de la estefenantrina como fármaco para la distrofia miotónica de tipo 1. Universidad de Valencia.
- García-Alcover, I., Colonques-Bellmunt, J., Garijo, R., Tormo, J. R., Artero, R., Álvarez-Abril, M. C., et al. (2014). Development of a drosophila melanogaster spliceosensor system for in vivo high-throughput screening in myotonic dystrophy type 1. *Dis Model Mech*,
- García-Lopez, A., Llamusi, B., Orzaez, M., Perez-Paya, E., & Artero, R. D. (2011). In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(29), 11866-71.

- Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M. C., & Artero, R. D. (2008). Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in drosophila. *PLoS One*, 3(2), e1595.
- Gareiss, P. C., Sobczak, K., McNaughton, B. R., Palde, P. B., Thornton, C. A., & Miller, B. L. (2008). Dynamic combinatorial selection of molecules capable of inhibiting the (CUG) repeat RNA-MBNL1 interaction in vitro: Discovery of lead compounds targeting myotonic dystrophy (DM1). *J Am Chem Soc*, 130(48), 16254-61.
- Giacomotto, J., & Segalat, L. (2010). High-throughput screening and small animal models, where are we? *Br J Pharmacol*, 160(2), 204-16.
- Goers, E. S., Purcell, J., Voelker, R. B., Gates, D. P., & Berglund, J. A. (2010). MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Res*, 38, 2467-2484.
- Goers, E. S., Voelker, R. B., Gates, D. P., & Berglund, J. A. (2008). RNA binding specificity of drosophila muscleblind. *Biochemistry*, 47(27), 7284-94.
- Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., et al. (2007). CTG trinucleotide repeat "big jumps": Large expansions, small mice. *PLoS Genet*, 3(4), e52.
- Gomes-Pereira, M., & Monckton, D. G. (2004). Mouse tissue culture models of unstable triplet repeats. *Methods Mol Biol*, 277, 215-27.
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308), 835-40.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 391, 85-100.
- Han, H., Irimia, M., Ross, P. J., Sung, H. K., Alipanahi, B., David, L., et al. (2013). MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature*, 498(7453), 241-5.
- Hao, M., Akrami, K., Wei, K., De Diego, C., Che, N., Ku, J. H., et al. (2008). Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 237, 403-310.
- Harley, H. G., Rundle, S. A., MacMillan, J. C., Myring, J., Brook, J. D., Crow, S., et al. (1993). Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet*, 52(6), 1164-74.
- Harmon, E. B., Harmon, M. L., Larsen, T. D., Yang, J., Glasford, J. W., & Perryman, M. B. (2011). Myotonic dystrophy protein kinase is critical for nuclear envelope integrity. *J Biol Chem*, 286(46), 40296-306.
- Harper, P. S. (2001). *Myotonic dystrophy* (3rd ed.). London: Saunders.

- Hernández-Hernández, O., Guiraud-Dogan, C., Sicot, G., Huguet, A., Luilier, S., Steidl, E., et al. (2013). Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain*, *136*, 957.
- Hidalgo, I. J., Raub, T. J., & Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, *96*, 736-749.
- Hino, S., Kondo, S., Sekiya, H., Saito, A., Kanemoto, S., Murakami, T., et al. (2007). Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*, *16*(23), 2834-43.
- Ho, T. H., Bundman, D., Armstrong, D. L., & Cooper, T. A. (2005). Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*, *14*(11), 1539-47.
- Ho, T. H., Charlet, B. N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S., & Cooper, T. A. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *Embo j*, *23*(15), 3103-12.
- Ho, T. H., Savkur, R. S., Poulos, M. G., Mancini, M. A., Swanson, M. S., & Cooper, T. A. (2005). Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J Cell Sci*, *118*(Pt 13), 2923-33.
- Hoet, S., Stévigny, C., Block, S., Opperdoes, F., Colson, P., Baldeyrou, B., et al. (2004). Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: Antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Medica*, *70*, 407-413.
- Hoffman, E. P., & Wang, J. (1993). Duchenne-becker muscular dystrophy and the nondystrophic myotonias. paradigms for loss of function and change of function of gene products. *Archives of Neurology*, *50*, 1227-1237.
- Houseley, J. M., Wang, Z., Brock, G. J., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., et al. (2005). Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to drosophila. *Hum Mol Genet*, *14*(6), 873-83.
- Hu, J., Speisky, H., & Cotgreave, I. A. (1995). The inhibitory effects of boldine, glaucine, and probucol on TPA-induced down regulation of gap junction function. relationships to intracellular peroxides, protein kinase C translocation, and connexin 43 phosphorylation. *Biochemical Pharmacology*, *50*, 1635-1643.
- Huang, C. J., Harootunian, A., Maher, M. P., Quan, C., Raj, C. D., McCormack, K., et al. (2006). Characterization of voltage-gated sodium-channel blockers by electrical stimulation and fluorescence detection of membrane potential. *Nature Biotechnology*, *24*, 436-446.
- Huang, C. J., Harootunian, A., Maher, M. P., Quan, C., Raj, C. D., McCormack, K., et al. (2006). Characterization of voltage-gated sodium-channel blockers by electrical stimulation and fluorescence detection of membrane potential. *Nature Biotechnology*, *24*, 439-446.

- Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., et al. (2012). Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DM1 locus. *PLoS Genetics*, *8*, e1003043.
- Huichalaf, C., Sakai, K., Jin, B., Jones, K., Wang, G. L., Schoser, B., et al. (2010). Expansion of CUG RNA repeats causes stress and inhibition of translation in myotonic dystrophy 1 (DM1) cells. *FASEB J*, *24*(10), 3706-19.
- Irion, U. (2012). Drosophila muscleblind codes for proteins with one and two tandem zinc finger motifs. *PLoS One*, *7*, e34248.
- Ivorra, M. D., Chuliá, S., Lugnier, C., & D'Ocon, M. P. (1993). Selective action of two aporphines at alpha 1-adrenoceptors and potential-operated Ca²⁺ channels. *European Journal of Pharmacology*, *23*, 165-174.
- Jaklevic, B., Uyetake, L., Lemstra, W., Chang, J., Leary, W., Edwards, A., et al. (2006). Contribution of growth and cell cycle checkpoints to radiation survival in drosophila. *Genetics*, *174*(4), 1963-72.
- Jansen, G., Groenen, P. J., Bachner, D., Jap, P. H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., et al. (1996). Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet*, *13*(3), 316-24.
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., & Thornton, C. A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet*, *13*(24), 3079-88.
- Jimenez, I., & Speisky, H. (2000). Biological disposition of boldine: *In vitro* and *in vivo* studies. *Phytotherapy Research*, *14*, 254-260.
- Jones, M. A., Gargano, J. W., Rhodenizer, D., Martin, I., Bhandari, P., & Grotewiel, M. (2009). A forward genetic screen in drosophila implicates insulin signaling in age-related locomotor impairment. *Exp Gerontol*, *44*(8), 532-40.
- Kaliman, P., & Llagostera, E. (2008). Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1. *Cell Signal*, *20*(11), 1935-41.
- Kalsotra, A., Singh, R. K., Gurha, P., Ward, A. J., Creighton, C. J., & Cooper, T. A. (2014). The Mef2 transcription network is disrupted in myotonic dystrophy heart tissue, dramatically altering miRNA and mRNA expression. *Cell Rep*, *6*(2), 336-45.
- Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., et al. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*, 11748-11753.
- Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., et al. (2003). A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science*, *302*(5652), 1978-80.

- Kanadia, R. N., Urbinati, C. R., Crusselle, V. J., Luo, D., Lee, Y. J., Harrison, J. K., et al. (2003). Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns*, 3(4), 459-62.
- Kang JJ1, C. Y. (1998). Effects of boldine on mouse diaphragm and sarcoplasmic reticulum vesicles isolated from skeletal muscle. *Planta Medica*, 64, 18-21.
- Kim, D. H., Langlois, M. A., Lee, K. B., Riggs, A. D., Puymirat, J., & Rossi, J. J. (2005). HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence. *Nucleic Acids Res*, 33(12), 3866-74.
- Kimura, T., Lueck, J. D., Harvey, P. J., Pace, S. M., Ikemoto, N., Casarotto, M. G., et al. (2009). Alternative splicing of RyR1 alters the efficacy of skeletal EC coupling. *Cell Calcium*, 45, 264-274.
- Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J. D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., et al. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*, 14(15), 2189-200.
- Kino, Y., Mori, D., Oma, Y., Takeshita, Y., Sasagawa, N., & Ishiura, S. (2004). Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet*, 13(5), 495-507.
- Klesert, T. R., Cho, D. H., Clark, J. I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., et al. (2000). Mice deficient in Six5 develop cataracts: Implications for myotonic dystrophy. *Nature Genetics*, 25, 105-109.
- Klesert, T. R., Otten, A. D., Bird, T. D., & Tapscott, S. J. (1997). Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat Genet*, 16(4), 402-6.
- Konieczny, P., Stepniak-Konieczna, E., & Sobczak, K. (2015). MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic Acids Res*, 42(17), 10873-87.
- Kreyszig, E. (1979). Applied mathematics. *Hoboken, NJ: John Wiley & Sons*,
- Krol, J., Fiszler, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M., & Krzyzosiak, W. J. (2007). Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol Cell*, 25(4), 575-86.
- Kumar, A., Kumar, V., Singh, S. K., Muthuswamy, S., & Agarwal, S. (2014). Imbalanced oxidant and antioxidant ratio in myotonic dystrophy type 1. *Free Radic Res*, 48, 503-510.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G. S., & Cooper, T. A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell*, 28(1), 68-78.
- Kwieciński, H., Ryniewicz, B., & Ostrzycki, A. (1992). Treatment of myotonia with antiarrhythmic drugs. *Acta Neurologica Scandinavica*, 86, 371-375.

- Ladd, A. N. (2013). CUG-BP, elav-like family (CELF)-mediated alternative splicing regulation in the brain during health and disease. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *56*, 456-464.
- Langlois, M. A., Lee, N. S., Rossi, J. J., & Puymirat, J. (2003). Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *7*, 670-680.
- Larsen, J., Pettersson, O. J., Jakobsen, M., Thomsen, R., Pedersen, C. B., Hertz, J. M., et al. (2011). Myoblasts generated by lentiviral mediated MyoD transduction of myotonic dystrophy type 1 (DM1) fibroblasts can be used for assays of therapeutic molecules. *BMC Research Notes*, *4*, 490.
- Lau, Y. S., Tian, X. Y., Mustafa, M. R., Murugan, D., Liu, J., Zhang, Y., et al. (2013). Boldine improves endothelial function in diabetic db/db mice through inhibition of angiotensin II-mediated BMP4-oxidative stress cascade. *British Journal of Pharmacology*, *170*, 1190-1198.
- Lee, J. E., Bennett, C. F., & Cooper, T. A. (2012). RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(11), 4221-6.
- Leger, A. J., Mosquea, L. M., Clayton, N. P., Wu, I. H., Weeden, T., Nelson, C. A., et al. (2013). Systemic delivery of a peptide-linked morpholino oligonucleotide neutralizes mutant RNA toxicity in a mouse model of myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Therapeutics*, *23*, 109-117.
- Lévy-Appert-Collin, M. C., & Lévy, J. (1977). Sur quelques préparations galéniques de feuilles de boldo (*peumus boldus*, nomiacées). *Journal De Pharmacie De Belgique*, *32*, 13-22.
- Li, L. B., Yu, Z., Teng, X., & Bonini, N. M. (2008). RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in drosophila. *Nature*, *453*(7198), 1107-11.
- Lin, J. H., & Lu, A. Y. (1998). Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, *36*, 361-390.
- Lin, X., Miller, J. W., Mankodi, A., Kanadia, R. N., Yuan, Y., Moxley, R. T., et al. (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*, *15*(13), 2087-97.
- Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., et al. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science*, *293*(5531), 864-7.
- Lissi, E. A., Cáceres, T., & Videla, L. A. (1986). Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. effect of additives and products accumulation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicin*, *2*, 63-69.
- Liu, K., Yang, T., Viswanathan, P. C., & Roden, D. M. (2005). New mechanism contributing to drug-induced arrhythmia: Rescue of a misprocessed LQT3 mutant. *Circulation*, *112*, 3239-3246.
- Livett, B. G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiological Reviews*, *64*, 1103-1161.

- Llagostera, E., Alvarez Lopez, M. J., Scimia, C., Catalucci, D., Parrizas, M., Ruiz-Lozano, P., et al. (2012). Altered beta-adrenergic response in mice lacking myotonic dystrophy protein kinase. *Muscle Nerve*, *45*(1), 128-30.
- Loghin, F., Chagraoui, A., Asencio, M., Comoy, E., Speisky, H., Cassels, B. K., et al. (2003). Effects of some antioxidative aporphine derivatives on striatal dopaminergic transmission and on MPTP-induced striatal dopamine depletion in B6CBA mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *18*, 133-140.
- Logigian, E. L., Martens, W. B., Moxley, R. T. t., McDermott, M. P., Dilek, N., Wiegner, A. W., et al. (2010). Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1. *Neurology*, *74*(18), 1441-8.
- Lopez Castel, A., Nakamori, M., Tome, S., Chitayat, D., Gourdon, G., Thornton, C. A., et al. (2011). Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues. *Hum Mol Genet*, *20*(1), 1-15.
- López de Munain, A., Blanco, A., Emparanza, J. I., Poza, J. J., Martí-Massó, J. F., Cobo, A., et al. (1993). Prevalence of myotonic dystrophy in guipúzcoa (basque country, spain). *Neurology*, *43*, 1573-1573.
- Lueck, J. D., Lungu, C., Mankodi, A., Osborne, R. J., Welle, S. L., Dirksen, R. T., et al. (2007). Chloride channelopathy in myotonic dystrophy resulting from loss of posttranscriptional regulation for CLCN1. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *292*, 1291-1297.
- Lueck, J. D., Mankodi, A., Swanson, M. S., Thornton, C. A., & Dirksen, R. T. (2007). Muscle chloride channel dysfunction in two mouse models of myotonic dystrophy. *The Journal of General Physiology*, *129*, 79-94.
- Maeda, M., Taft, C. S., Bush, E. W., Holder, E., Bailey, W. M., Neville, H., et al. (1995). Identification, tissue-specific expression, and subcellular localization of the 80- and 71-kDa forms of myotonic dystrophy kinase protein. *J Biol Chem*, *270*(35), 20246-9.
- Mahadevan, M. S. (2012). Myotonic dystrophy: Is a narrow focus obscuring the rest of the field? *Curr Opin Neurol*, *25*(5), 609-13.
- Mahadevan, M. S., Yadava, R. S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-McCardell, C. D., Bourne, T. D., et al. (2006). Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat Genet*, *38*(9), 1066-70.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., et al. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*, *289*(5485), 1769-73.
- Mankodi, A., Takahashi, M. P., Jiang, H., Beck, C. L., Bowers, W. J., Moxley, R. T., et al. (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell*, *10*(1), 35-44.

- Mankodi, A., Teng-Umuay, P., Krym, M., Henderson, D., Swanson, M., & Thornton, C. A. (2003). Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Ann Neurol*, *54*(6), 760-8.
- Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q. P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., et al. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet*, *10*(19), 2165-70.
- Mao, C., Flavin, K. G., Wang, S., Dodson, R., Ross, J., & Shapiro, D. J. (2006). Analysis of RNA-protein interactions by a microplate-based fluorescence anisotropy assay. *Analytical Biochemistry*, *350*, 222-232.
- Marsh, J. L., & Thompson, L. M. (2004). Can flies help humans treat neurodegenerative diseases? *Bioessays*, *26*(5), 485-96.
- Martínez, L. A., Ríos, J. L., Payá, M., & Alcaraz, M. J. (1992). Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzylisoquinoline alkaloids. *Free Radical Biology & Medicine*, *12*, 287-292.
- Marty, A., & Neher, E. (1985). Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, *367*, 117-141.
- Mateos-Aierdi, A. J., Goicoechea, M., Aiausti, A., Fernández-Torrón, R., Garcia-Puga, M., Matheu, A., et al. (2015). Muscle wasting in myotonic dystrophies: A model of premature aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *7*, 127.
- Mathieu, J., & Prévost, C. (2012). Epidemiological surveillance of myotonic dystrophy type 1: A 25-year population-based study. *Neuromuscular Disorders : NMD*, *22*, 974-979.
- McAuliffe, J. J., Gao, L. Z., & Solaro, R. J. (1990). Changes in myofibrillar activation and troponin C Ca²⁺ binding associated with troponin T isoform switching in developing rabbit heart. *Circ Res*, *66*(5), 1204-16.
- Melis, V., Usach, I., & Peris, J. (2012). Determination of sertraline in rat plasma by HPLC and fluorescence detection and its application to in vivo pharmacokinetic studies. *Journal of Separation Science*, *35*(23), 3302-3307.
- Meola, G., & Cardani, R. (2014). Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim Biophys Acta*.
- Michalowski, S., Miller, J. W., Urbinati, C. R., Paliouras, M., Swanson, M. S., & Griffith, J. (1999). Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein. *Nucleic Acids Res*, *27*(17), 3534-42.
- Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., et al. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo j*, *19*(17), 4439-48.
- Mizielinska, S., Grönke, S., Niccoli, T., Ridler, C. E., Clayton, E. L., Devoy, A., et al. (2014). C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in drosophila through arginine-rich proteins. *Science*, *345*, 1192-1194.

- Mollataghi, A., Coudiere, E., Hadi, A. H., Mukhtar, M. R., Awang, K., Litaudon, M., et al. (2012). Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of beilschmiedia species. *Fitoterapia*, *83*, 298-302.
- Mooers, B. H., Logue, J. S., & Berglund, J. A. (2005). The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(46), 16626-31.
- Moro, M. A., López, M. G., Gandía, L., Michelena, P., & García, A.,G. (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Analytical Biochemistry*, *185*, 243-248.
- Mount, S. M., Burks, C., Hertz, G., Stormo, G. D., White, O., & Fields, C. (1992). Splicing signals in drosophila: Intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acids Research*, *20*, 4255-4262.
- Mulders, S. A., van den Broek, W. J., Wheeler, T. M., Croes, H. J., van Kuik-Romeijn, P., de Kimpe, S. J., et al. (2009). Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(33), 13915-20.
- Muthna, D., Cmielova, J., Tomsik, P., & Rezacova, M. (2013). Boldine and related aporphines: From antioxidant to antiproliferative properties. *Natural Products Communications*, *8*, 1797-1800.
- Nakamori, M., Gourdon, G., & Thornton, C. A. (2011). Stabilization of expanded (CTG) \bullet (CAG) repeats by antisense oligonucleotides. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *19*, 2222-2227.
- Nakazora, H., & Kurihara, T. (2005). The effect of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) on myotonia: Intracellular studies. *Intern Med*, *44*(12), 1247-51.
- Narang, M. A., Waring, J. D., Sabourin, L. A., & Korneluk, R. G. (2000). Myotonic dystrophy (DM) protein kinase levels in congenital and adult DM patients. *Eur J Hum Genet*, *8*(7), 507-12.
- O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., & Speisky, H. (2006). Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions*, *159*, 1-17.
- Orengo, J. P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D. R., Snipes, G. J., & Cooper, T. A. (2008). Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(7), 2646-51.
- Osborne, R. J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J. R., Swanson, M. S., et al. (2009). Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*, *18*(8), 1471-81.
- Pambrun, T., Mercier, A., Chatelier, A., Patri, S., Schott, J. J., Le Scouarnec, S., et al. (2014). Myotonic dystrophy type 1 mimics and exacerbates brugada phenotype induced by Nav1.5 sodium channel loss-of-function mutation. *Heart Rhythm*, *11*, 1393-1400.

- Panaite, P. A., Kielar, M., Kraftsik, R., Gourdon, G., Kuntzer, T., & Barakat-Walter, I. (2011). Peripheral neuropathy is linked to a severe form of myotonic dystrophy in transgenic mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *70*, 678-685.
- Pandey, S. K., Wheeler, T. M., Justice, S. L., Kim, A., Younis, H., Gattis, D., et al. (2015). Identification and characterization of modified antisense oligonucleotides targeting DMPK in mice and nonhuman primates for the treatment of myotonic dystrophy type 1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *353*(2), 411-36.
- Pandey, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human disease models in drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev*, *63*(2), 411-36.
- Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L., & Artero, R. (2006). The muscleblind family of proteins: An emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation*, *74*(2-3), 65-80.
- Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N. J., Comai, L., et al. (2006). Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *25*, 4271-4273.
- Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., et al. (2010). How to improve R&D productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *9*
- Pearson, C. E. (2011). Repeat associated non-ATG translation initiation: One DNA, two transcripts, seven reading frames, potentially nine toxic entities! *PLoS Genet*, *7*(3), e1002018.
- Pearson, C. E., Nichol Edamura, K., & Cleary, J. D. (2005). Repeat instability: Mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet*, *6*(10), 729-42.
- Penisson-Besnier, I., Devillers, M., Porcher, R., Orlikowski, D., Doppler, V., Desnuelle, C., et al. (2008). Dehydroepiandrosterone for myotonic dystrophy type 1. *Neurology*, *71*(6), 407-12.
- Perbellini, R., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Cardani, R., Capogrossi, M. C., Meola, G., et al. (2011). Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*, *21*(2), 81-8.
- Perfetti, A., Greco, S., Bugiardini, E., Cardani, R., Gaia, P., Gaetano, C., et al. (2014). Plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*, *24*(6), 509-15.
- Peric, S., Sreckov, M., Basta, I., Lavrnjic, D., Vujnic, M., Marjanovic, I., et al. (2014). Dependent and paranoid personality patterns in myotonic dystrophy type 1. *Acta Neurologica Scandinavica*, *129*, 219-225.
- Pettersson, O. J., Aagaard, L., Andrejeva, D., Thomsen, R., Jensen, T. G., & Damgaard, C. K. (2014). DDX6 regulates sequestered nuclear CUG-expanded DMPK-mRNA in dystrophia myotonica type 1. *Nucleic Acids Research*, *42*, 7186-7200.

- Pettersson, O. J., Aagaard, L., Jensen, T. G., & Damgaard, C. K. (2015). Molecular mechanisms in DM1 - a focus on foci. *Nucleic Acids Research*, *43*, 2433-2441.
- Philips, A. V., Timchenko, L. T., & Cooper, T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science*, *280*(5364), 737-41.
- Phylactou, L. A. (2004). Repair of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) transcripts by trans-splicing ribozymes. *Methods Mol Biol*, *252*, 373-83.
- Phylactou, L. A., Darrah, C., & Wood, M. J. (1998). Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nat Genet*, *18*(4), 378-81.
- Picchio, L., Plantie, E., Renaud, Y., Poovthumkadavil, P., & Jagla, K. (2013). Novel drosophila model of myotonic dystrophy type 1: Phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum Mol Genet*, *22*(14), 2795-810.
- Poulos, M. G., Batra, R., Li, M., Yuan, Y., Zhang, C., Darnell, R. B., et al. (2013). Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Hum Mol Genet*, *22*(17), 3547-58.
- Pugsley, M. K., Authier, S., & Curtis, M. J. (2008). Principles of safety pharmacology. *Br J Pharmacol*, *154*, 1382-1399.
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*, 23-36.
- Ranum, L. P., & Cooper, T. A. (2006). RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci*, *29*, 259-77.
- Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, J. P., Fischer, M. C., Jost, B., et al. (2011). Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol*, *18*(7), 840-5.
- Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, *24*, 981-990.
- Reddy, S., Smith, D. B., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M., et al. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet*, *13*(3), 325-35.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in drosophila melanogaster. *Genome Res*, *11*(6), 1114-25.
- Roberts, R., Timchenko, N. A., Miller, J. W., Reddy, S., Caskey, C. T., Swanson, M. S., et al. (1997). Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(24), 13221-6.
- Rudnicki, D. D., Holmes, S. E., Lin, M. W., Thornton, C. A., Ross, C. A., & Margolis, R. L. (2007). Huntington's disease--like 2 is associated with CUG repeat-containing RNA foci. *Ann Neurol*, *61*(3), 272-82.
- Salisbury, E., Sakai, K., Schoser, B., Huichalaf, C., Schneider-Gold, C., Nguyen, H., et al. (2008). Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts

- through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1. *Exp Cell Res*, 314(11-12), 2266-78.
- Salvatori, S., Furlan, S., Fanin, M., Picard, A., Pastorello, E., Romeo, V., et al. (2009). Comparative transcriptional and biochemical studies in muscle of myotonic dystrophies (DM1 and DM2). *Neurol Sci*, 30(3), 185-92.
- Sanguinetti, M. C., & Mitcheson, J. S. (2005). Predicting drug-hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26, 119-124.
- Santanam, N., Penumetcha, M., Speisky, H., & Parthasarathy, S. (2004). A novel alkaloid antioxidant, boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL in-vitro and atherosclerosis in vivo in LDLR(-/-) mice. *Atherosclerosis*, 173, 203-210.
- Santoro, M., Piacentini, R., Masciullo, M., Bianchi, M. L., Modoni, A., Podda, M. V., et al. (2014). Alternative splicing alterations of Ca²⁺ handling genes are associated with Ca²⁺ signal dysregulation in myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2) myotubes. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 40(4), 464-76.
- Sarkar, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., et al. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet*, 25(1), 110-4.
- Sato, Y., Kamo, S., Takahashi, T., & Suzuki, Y. (1995). Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: Hemolysis by water-soluble radical initiator. *Biochemistry*, 34, 8940-8949.
- Savkur, R. S., Philips, A. V., & Cooper, T. A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet*, 29(1), 40-7.
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C. A., Wattez, A., et al. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*, 10(19), 2143-55.
- Sicot, G., Gourdon, G., & Gomes-Pereira, M. (2011). Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: New findings and future challenges. *Hum Mol Genet*, 20(R2), R116-23.
- Tang, Z. Z., Yarotsky, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K., et al. (2011). Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of ca(V)1.1 calcium channel. *Human Molecular Genetics*, 21, 1312-1324.
- Teplova, M., & Patel, D. J. (2008). Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat Struct Mol Biol*, 15(12), 1343-51.
- Thornton, C. A., Johnson, K., & Moxley, R. T., 3rd. (1994). Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann Neurol*, 35(1), 104-7.

- Thornton, C. A., Wymer, J. P., Simmons, Z., McClain, C., & Moxley, R. T.,3rd. (1997). Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet*, *16*(4), 407-9.
- Timchenko, L., Monckton, D. G., & Caskey, C. T. (1995). Myotonic dystrophy: An unstable CTG repeat in a protein kinase gene. *Semin Cell Biol*, *6*(1), 13-9.
- Timchenko, N. A., Cai, Z. J., Welm, A. L., Reddy, S., Ashizawa, T., & Timchenko, L. T. (2001). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem*, *276*(11), 7820-6.
- Timchenko, N. A., Iakova, P., Cai, Z. J., Smith, J. R., & Timchenko, L. T. (2001). Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol*, *21*(20), 6927-38.
- Trip, J., Drost, G., van Engelen, B. G., & Faber, C. G. (2006). Drug treatment for myotonia. *Cochrane Database Syst Rev*, *CD004762*.
- Udd, B., & Krahe, R. (2012). The myotonic dystrophies: Molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol*, *11*(10), 891-905.
- 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*, e16.
- van de Waterbeemd, H. (1998). The fundamental variables of the biopharmaceutics classification system (BCS): A commentary. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *7*, 1-3.
- Venables, J. P., Tazi, J., & Juge, F. (2012). Regulated functional alternative splicing in drosophila. *Nucleic Acids Research*, *40*, 1-10.
- Vicente-Crespo, M., Pascual, M., Fernandez-Costa, J. M., Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Miranda, M. E., et al. (2008). Drosophila muscleblind is involved in troponin T alternative splicing and apoptosis. *PLoS One*, *3*(2), e1613.
- Vlachopapadopoulou, E., Zachwieja, J. J., Gertner, J. M., Manzione, D., Bier, D. M., Matthews, D. E., et al. (1995). Metabolic and clinical response to recombinant human insulin-like growth factor I in myotonic dystrophy--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*, *80*(12), 3715-23.
- Wahbi, K., Algalarrondo, V., Becane, H. M., Fressart, V., Beldjord, C., Azibi, K., et al. (2013). Brugada syndrome and abnormal splicing of SCN5A in myotonic dystrophy type 1. *Arch Cardiovasc Dis*, *106*(12), 635-43.
- Walker, J. A., & Bernards, A. (2014). A drosophila screen identifies neurofibromatosis-1 genetic modifiers involved in systemic and synaptic growth. *Rare Dis*, *2*, e28341.
- Wang, Y. H., Amirhaeri, S., Kang, S., Wells, R. D., & Griffith, J. D. (1994). Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science*, *265*, 669-671.
- Wang, G. S., Kuyumcu-Martinez, M. N., Sarma, S., Mathur, N., Wehrens, X. H., & Cooper, T. A. (2009). PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *J Clin Invest*, *119*(12), 3797-806.

- Warf, M. B., & Berglund, J. A. (2007). MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *Rna*, *13*(12), 2238-51.
- Warf, M. B., Nakamori, M., Matthys, C. M., Thornton, C. A., & Berglund, J. A. (2009). Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(44), 18551-6.
- Wheeler, T. M., Leger, A. J., Pandey, S. K., MacLeod, A. R., Nakamori, M., Cheng, S. H., et al. (2012). Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature*, *488*, 111-115.
- Wheeler, T. M., Lueck, J. D., Swanson, M. S., Dirksen, R. T., & Thornton, C. A. (2007). Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*, 3952-3957.
- Wheeler, T. M., Krym, M. C., & Thornton, C. A. (2007). Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord*, *17*(3), 242-7.
- Wheeler, T. M., Sobczak, K., Lueck, J. D., Osborne, R. J., Lin, X., Dirksen, R. T., et al. (2009). Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science*, *325*(5938), 336-9.
- Wojciechowska, M., Taylor, K., Sobczak, K., Napierala, M., & Krzyzosiak, W. J. (2014). Small molecule kinase inhibitors alleviate different molecular features of myotonic dystrophy type 1. *RNA Biol*, *11*(6), 742-54.
- Wong, C. H., Nguyen, L., Peh, J., Luu, L. M., Sanchez, J. S., Richardson, S. L., et al. (2014). Targeting toxic RNAs that cause myotonic dystrophy type 1 (DM1) with a bisamidinium inhibitor. *J Am Chem Soc*, *136*(17), 6355-61.
- Xia, G., Gao, Y., Jin, S., Subramony, S. H., Terada, N., Ranum, L. P., et al. (2015). Genome modification leads to phenotype reversal in human myotonic dystrophy type 1 induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells. *Stem Cells*, *33*, 1829-1838.
- Yadava, R. S., Frenzel-McCardell, C. D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A. L., Puymirat, J., et al. (2008). RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nat Genet*, *40*(1), 61-8.
- Yotova, V., Labuda, D., Zietkiewicz, E., Gehl, D., Lovell, A., Lefebvre, J. F., et al. (2005). Anatomy of a founder effect: Myotonic dystrophy in northeastern quebec. *Human Genetics*, *117*, 177-185.
- Youn, Y. C., Kwon, O. S., Han, E. S., Song, J. H., Shin, Y. K., & Lee, C. S. Effects of some antioxidative aporphine derivatives on striatal dopaminergic transmission and on MPTP-induced striatal dopamine depletion in B6CBA mice. *Biochemical Pharmacology*, *63*, 495-505.

- Zhang, J. H., Chung, T. D., & Oldenburg, K. R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening*, 4, 67-73.
- Zhao, Q., Zhao, Y., & Wang, K. (2006). Antinociceptive and free radical scavenging activities of alkaloids isolated from *Lindera angustifolia* Chen. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 408-413.
- Zu, T., Gibbens, B., Doty, N. S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M. D., et al. (2011). Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(1), 260-5.

Fin.