



**Fundació**  
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM  
Malalties neurodegeneratives



# **MODULACIÓ DEL DÈFICIT DE LA PLASTICITAT SINÀPTICA COM A ESTRATÈGIA TERAPÈUTICA EN LA MALALTIA DE HUNTINGTON**

**Jordi Alberch Vié**

Facultat de Medicina UB

**Isabel Pérez Otaño**

Universitat Miguel Hernández. Alacant

## 1. Resum

La degeneració selectiva de neurones espinoses mitjanes (MSN) ha estat considerada la principal causa de les alteracions motores en la malaltia de Huntington (HD). No obstant això, resultats recents demostren que la disfunció sinàptica i neuronal corticostriatal es produeix molt abans de la pèrdua neuronal. Per tant, la investigació per dissenyar noves intervencions terapèutiques per a l'HD s'ha centrat en l'estudi dels mecanismes moleculars subjacents a la disfunció de la plasticitat neuronal. En aquest escenari, el projecte té com a objectiu identificar les vies intracel·lulars afectades per la huntingtina mutada implicades en la disfunció de la plasticitat neuronal per dissenyar noves estratègies terapèutiques per prevenir o retardar els trastorns motors i cognitius en HD. Per assolir aquest objectiu, analitzarem si es pot restaurar la plasticitat neuronal mitjançant la modulació de: 1) senyalització BDNF / TrkB / p75NTR i 2) l'equilibri d'inhibició-excitació implicat en els circuits corticostriatals i nigrostriatals.

Metodologia. S'utilitzaran models de ratolí HD (ratolins R6/1, HdhQ7/Q111 i YAC128) i models humans HD (les neurones MSN derivades de cèl·lules mare pluripotents induïdes per HD (iPSC)). Establirem un nou protocol per diferenciar les iPSC de les neurones corticals, nigral i estriatals per estudiar la interacció cèl·lula-cèl·lula afectada per la huntingtina mutada. Els canvis en la plasticitat s'avaluaran analitzant espines dendrítiques utilitzant el sistema Helios Gene Gun en iPSC i cultius organotípics. L'activitat neuronal també es mesurarà mitjançant immunohistoquímica i *Western blot* utilitzant marcadors específics sinàptics i de citoesquelet. L'electrofisiologia s'utilitzarà per analitzar l'activitat dels receptors NMDA i AMPA. S'utilitzaran estímuls optogenètics en models *in vivo* i *in vitro*. S'analitzarà la connectivitat de xarxes neuronals utilitzant imatges de calci d'alta velocitat.

Resultats esperats. El nostre projecte busca noves molècules similars a BDNF amb potencial terapèutic per a l'HD i la comprensió dels mecanismes moleculars implicats en el desequilibri inhibició-excitació dels ganglis basals per identificar noves dianes terapèutiques en HD. L'ús de models humans d'HD pot ajudar a apropar-nos a l'aplicació dels resultats en assajos clínics.

## 2. Resultats

Estudiar els mecanismes de formació d'espines dendrítiques i l'activitat sinàptica afectats en models HD en estat de repòs i després d'estimulació neuronal

### **Pyk2 modula les sinapsis excitadores de l'hipocamp i contribueix als dèficits cognitius en un model de malaltia de Huntington**

S'estudia el paper de Pyk2, una proteïna tirosina cinasa dependent de calci, altament expressada en l'hipocamp. L'aprenentatge relacionat amb l'hipocamp i la potenciació a llarg termini de la CA1 es veuen greument afectats en ratolins deficientes en Pyk2 i estan associats amb alteracions en els receptors NMDA, PSD-95 i espines dendrítiques. En neurones cultivades de l'hipocamp, Pyk2 té rols autofosforilació dependents i independents que determinen l'enriquiment de PSD-95 i la densitat de les espines dendrítiques. Els nivells de Pyk2 es redueixen en l'hipocamp de pacients amb la malaltia de Huntington i en el model de ratolí R6/1. Normalitzant els nivells de Pyk2 a l'hipocamp es rescata el dèficit de memòria en ratolins R6/1, la patologia de les espines i la localització del PSD-95. Els nostres resultats revelen un paper per a Pyk2 en l'estructura de les espines dendrítiques i la funció sinàptica, tot suggerint que el seu dèficit contribueix a les alteracions cognitives en la malaltia de Huntington (*Nature Communications*, 30 de maig de 2017; 8: 1559). Amb aquestes dades també vam observar un possible paper de Pyk2 en la resposta a l'estrès, i en l'expressió de marcadors sinàptics i la regulació de la densitat de les espines dendrítiques en l'amígdala, que suggereixen que Pyk2 contribueix a la resposta a l'estrès a través de canvis microestructurals, i que el seu dèficit pugui contribuir a la regulació de l'estrès crònic (*Translational Psychiatry*, 2019, 15 de gener; 9 (1): 3).

### **GluN3A promou l'activitat dels receptors NMDA i augmenta la transmissió sinàptica en els models de malaltia de Huntington**

Les subunitats de GluN3A han estat relacionades amb la pèrdua de sinapsis i la mort de les neurones de projecció amb espines del nucli estriat en la malaltia de Huntington. Els nostres resultats mostren que la supressió d'expressió de GluN3A impedeix un fenotip de transmissió sinàptica multivariant que precedeix els signes morfològics en les primeres etapes prodròmiques. Utilitzant un mètode electrofisiològic altament sensible en talls corticostriatals, hem observat una millora en la resposta sinàptica com a mecanisme que desencadena un tipus d'excitabilitat elèctrica dependent d'NMDAR en

dendrites. Els nostres resultats destaquen també un paper del glutamat activant els receptors NMDA extrasinàptics. Per tant, aquestes dades impliquen la reactivació de les subunitats GluN3A en un ampli espectre de dèficits de transmissió sinàptica en fase primerenca en els ratolins YAC128; qüestionar el concepte actual que la deslocalització de NMDAR és el desencadenant patològic en HD; i introduir pics d'NMDA com a nou mecanisme candidat per acoblar els NMDAR a la neurodegeneració (*Neurobiology of Disease*, setembre de 2016; 93: 47-56).

### **Augment dels nivells de Rictor que impedeixen la degeneració neuronal induïda per la huntingtina mutada**

Rictor s'associa amb mTOR per formar el complex mTORC2, que regula la funció neuronal i la supervivència. Aquí hem analitzat si l'activitat d'mTORC2 es podria alterar per la presència de huntingtina mutada. Vam observar que els nivells de Rictor s'incrementen específicament en el nucli estriat dels models de ratolí amb HD, i en el putamen dels pacients amb HD. La interacció Rictor-mTOR i els nivells de fosforilació d'Akt, una de les dianes del complex mTORC2, es van incrementar en el nucli estriat del model de ratolí R6/1, fet que suggereix un augment de la senyalització mTORC2. És interessant destacar que la regulació aguda de Rictor en les neurones estriatals *in vitro* redueix l'activitat d'mTORC2, tal com es mostra en nivells reduïts de fosfat-Akt, i produeix un augment de la mort cel·lular induïda per huntingtina mutada. Així, la sobreexpressió de Rictor augmenta l'activitat d'mTORC2 i evita la mort cel·lular. A més a més, la normalització dels nivells endògens de Rictor al nucli estriat dels ratolins R6/1 empitjora els símptomes motors, fet que suggereix una inducció de la disfunció neuronal. En conclusió, els nostres resultats suggereixen que l'augment dels nivells estriatals de Rictor podria contrarestar la disfunció neuronal induïda per la huntingtina mutada (*Molecular Neurobiology*, 2018 octubre; 55 (10): 7728-7742).

Estudi de l'equilibri entre BDNF i TrkB / p75NTR en MSN derivades de l'iPSC HD

### **Les neurones derivades d'hPSC són funcionalment madurades *in vitro* i s'integren en el nucli estriat d'un ratolí *in vivo***

Hem desenvolupat un nou protocol per a la diferenciació d'hPSC per a neurones telencefàliques madures i fisiològicament actives en 37 dies, que és útil per a aplicacions de modelatge de malalties humanes, test de medicaments i teràpia cel·lular. En aquest estudi es va utilitzar una línia hPSC induïda (33Q # 1) i una línia

embrionària hPSC (Genea 19). Les nostres dades mostren que els cultius neuronals derivats d'hiPSC 33Qn1 tenen una activitat espontània amb característiques neuronals diferencials DIV 37 (Comella *et al.*, manuscrit en preparació).

Generar noves molècules que restaurin la plasticitat neuronal i l'equilibri TrkB / p75NTR en models d'HD

### **El 7,8-dihidroxi flavona millora els dèficits cognitius i motors en un model de ratolí de la malaltia de Huntington mitjançant l'activació específica de la via PLC $\gamma$ 1**

L'administració crònica de 7,8-DHF va retardar els dèficits motors dels ratolins R6/1 i va revertir els dèficits del test de reconeixement de nous objectes (NORT) a les 17 setmanes. Les anàlisis morfològiques i bioquímiques indicaven una millora dels nivells estriatals d'encefalina i la prevenció de la pèrdua de volum estriatal. Hem trobat una recuperació de fosforilació de TrkBY816, però no de TrkBY515 en el nucli estriat, d'acord amb els resultats *in vitro*. A més, el tractament amb 7,8-DHF va millorar el desequilibri de p75 / TrkB. Els nostres resultats proporcionen noves dades sobre el mecanisme d'acció del 7,8-DHF, que suggereix que el seu efecte en el receptor de TrkB en el nucli estriat és per via de la fosforilació selectiva del residu Y816 i l'activació de la via PLC $\gamma$ 1, i que els efectes pleotròpics de la 7,8-DHF també contribueixen al seu potencial terapèutic (*Human Molecular Genetics*, 2017, 15 d'agost; 26 (16): 3144-3160).

### **El polipèptid activador de l'adenilat ciclasi hipofisari (PACAP) millora la plasticitat sinàptica de l'hipocamp i millora el rendiment de la memòria a la malaltia de Huntington**

El polipèptid activador de l'adenilat ciclasi hipofisari (PACAP) és un neuropèptid que exerceix un efecte neuroprotector, principalment a través del receptor PAC1. Hem investigat l'efecte de l'estimulació del receptor PACAP per millorar el desenvolupament de la memòria en HD. Es va observar una disminució en l'hipocamp en l'expressió dels tres receptors PACAP en diferents models de ratolí des del començament de la disfunció cognitiva. En l'hipocamp de mostres humanes *post mortem*, hem trobat una disminució específica de PAC1, sense canvis en els receptors VPAC1 i VPAC2. També hem trobat que el tractament amb PACAP rescata el nivell de PAC1 en ratolins R6/1, augmenta l'expressió del factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF) en l'hipocamp i

redueix la formació d'agregats de huntingtina mutada. A més, l'administració de PACAP va contrarestar els dèficits de memòria de ratolins R6/1 analitzats amb el NORT i la tasca d'alternança espontània de T-maze. És important destacar l'efecte del PACAP sobre el rendiment cognitiu que es va associar amb un augment de l'immunomarcatge amb VGlut-1 i PSD95 a l'hipocamp de ratolins R6/1. En conjunt, aquests resultats suggereixen que el PACAP, actuant mitjançant l'estimulació del receptor PAC1, pot tenir un potencial terapèutic per contrarestar els dèficits cognitius induïts en HD (*Molecular Neurobiology*, 2018 novembre; 55 (11): 8263-8277).

Desenvolupar noves estratègies per controlar l'equilibri inhibició-excitació en circuits corticostriatals i nigrostriatals, *in vitro* i *in vivo*

### **NETCAL: una plataforma interactiva per a l'anàlisi a gran escala de NETWORK i dinàmica de població a través d'imatges de CALci**

Hem desenvolupat NETCAL, una plataforma de programari completa desenvolupada amb MATLAB per enregistrar, gestionar i analitzar experiments d'imatges de calci d'alta resolució i d'alta velocitat. La facilitat d'ús de la interfície gràfica interactiva i una documentació exhaustiva s'adapten als investigadors del laboratori experimental, però també a científics experimentats de dades a través del seu sistema de connectors (*plugins*) i *scripts*. Hem desenvolupat un ampli conjunt d'eines i incorporem algorismes i caixes d'eines d'última generació per a l'anàlisi a gran escala de la dinàmica de la xarxa i de la població, incloent-hi: la detecció automatitzada de cèl·lules (estàtica i dinàmica); disseny i selecció de població mitjançant aprenentatge automàtic, agrupació i reconeixement de patrons; dinàmica de descàrregues (*burst*); detecció de pics; inferència de xarxa (de xarxes funcionals a relacions causals), i molt més. Diverses d'aquestes eines també estan disponibles en temps real; així les cèl·lules i els punts es poden controlar mentre s'està gravant l'experiment, fet que dona al investigador una àmplia informació sobre com s'està desenvolupant.

Hem provat i utilitzat el programari en diverses preparacions experimentals i equips de laboratori. NETCAL ja s'ha utilitzat per provar la viabilitat i el rendiment dels protocols de diferenciació de cèl·lules mare pluripotents induïdes per humans (hiSPC); per caracteritzar el comportament individual i col·lectiu de cultius corticals i estriatals dissociats a partir dels models de ratolí de l'HD; per revelar la comunicació entre neurones i astròcits en els cultius de l'hipocamp de rata; i per detectar patrons

d'activitat de propagació en cultius corticals. Tot i que ha estat desenvolupat per a enregistraments de calci en cultius, hem provat i utilitzat amb èxit enregistraments *in vivo* per analitzar dades de matrius de múltiples elèctrodes.

NETCAL ha estat desenvolupat per científics perquè altres científics promoguin i fomentin el desenvolupament d'eines per a la replicació i validació de resultats experimentals. El programari és altament modular i la seva aplicació té una extensibilitat fàcil d'adaptar a les necessitats específiques de qualsevol grup de recerca. Orlandi *et al.* *Zenodo*. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1119026> [www.itsnetcal.com](http://www.itsnetcal.com)

JG. Orlandi; S Fernández-García; A Comella-Bolla; M Masana; G García-Díaz Barriga; M Yaghoubi; Un Kipp; JM. Canals; MA. Colicos; J Davidsen; J Alberch; J Soriano. (2017). *NETCAL: una plataforma interactiva per a l'anàlisi de dinàmica poblacional a gran escala de NETWORK i enregistraments d'imatges de CALcium (versió 7.0.0 Open Beta)*. *Zenodo*. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1119026> [www.itsnetcal.com](http://www.itsnetcal.com)

### **Connectivitat de la xarxa neuronal i disfunció dinàmica en els cultius estriatals de la malaltia de Huntington**

Utilitzant imatges de calci d'alta resolució, vam mostrar que els cultius estriatals R6/1 presentaven menys neurones actives que els WT. A més, els dos cultius estriatals són capaços d'autoorganitzar-se i produir esdeveniments col·lectius d'activitats gairebé síncrones, tot indicant la presència d'una xarxa funcional. Les ràfegues de xarxa presenten una durada i una amplitud similars entre els genotips, mentre que l'interval entre les ràfegues es redueix significativament en els cultius estriatals HD R6/1 respecte dels WT. El bloqueig dels receptors GABAA per Bicuculline (BIC) va augmentar el nombre de neurones actives i va impulsar una activitat coherent al llarg del cultiu fins a nivells similars tant en WT com en R6/1 HD, situació que suggereix un deteriorament de la inhibició estriatal GABAèrgica en HD. A més, les anàlisis de connectivitat funcional van revelar una disminució del grau d'entrada en la xarxa estriatal R6/1, així com un menor nombre de mòduls connectats de neurones, tot identificant una comunicació defectuosa a la xarxa neuronal estriatal R6/1. No obstant això, la disfunció de la xarxa estriatal en HD pot sorgir no només d'inhibició local, sinó que probablement s'aconseguirà una activitat aferent aberrant. La modulació de l'activitat estriatal amb NMDA va restaurar parcialment la dinàmica de la xarxa. L'eficiència global es va incrementar i l'estadística comunitària va disminuir de manera

específica en cultius estriatals R6/1 aconseguint ambdós paràmetres nivells similars a la xarxa estriatal basal WT. A més, el nombre de connectors va augmentar lleument després de l'addició d'NMDA a les xarxes estriatals WT i R6/1. Aquests resultats suggereixen que l'augment de la unitat excitadora de la xarxa és capaç de restaurar parcialment el flux d'informació a través de la xarxa estriatal R6/1 (Fernández-García *et al.*, manuscrit en preparació).

### **L'estimulació optogenètica de la via corticostriatal millora el comportament motor en la malaltia de Huntington**

Utilitzant matrius de multielèctrodes *in vivo*, RMN, optogenètica i microdiàlisi, vam caracteritzar la disfunció corticostriatal en HD. A continuació vam aplicar l'estimulació optogenètica repetida en ratolins simptomàtics R6/1 HD i vam avaluar l'aprenentatge i la coordinació motors. L'RMN estructural i funcional mostra la pèrdua de la funció corticostriatal en ratolins R6/1 HD. A més, es va observar una reducció dels nivells de glutamat estriatal (GluCEST i MRS) i de l'alliberament corticostriatal (optogenètica acoblada a la microdiàlisi). La resposta electrofisiològica de les neurones estriatals a la funció corticostriatal induïda òpticament també es va reduir en els ratolins HD (MEA). Finalment, l'estimulació optogenètica corticostriatal repetida en ratolins HD simptomàtics (R6/1-ChR2) va millorar l'aprenentatge motor (*accelerating rotarod*), la coordinació, l'activitat exploratòria i el comportament estereotipat, comparat amb els ratolins R6/1-YFP controls, gairebé arribant als nivells de WT. Aquesta millora va anar acompanyada d'un augment de la densitat de les espines dendrítiques mesurat a partir de la tinció de Golgi. Per tant, els nostres resultats demostren per primera vegada una recuperació efectiva induïda per optogenètica dels símptomes motors HD *in vivo* (Fernández-García *et al.*, manuscrit en preparació).

### **El silenciament GluN3A amb RNAi impedeix i reverteix els fenotips de la malaltia induïts per la huntingtina mutada.**

Hem provat el potencial terapèutic de silenciar l'expressió de GluN3A en ratolins YAC128, un model HD ben establert. Es van generar virus adenoassociats recombinants que codifiquen un ARN contra GluN3A (rAAV-shGluN3A) i es va comparar la capacitat dels diferents serotips en MSN. Una única injecció de rAAV9-shGluN3A en el nucli estriat de ratolins d'1 mes (> 90%) redueix l'expressió de GluN3A en MSN i prevé la pèrdua de les espines dendrítiques i la millora del rendiment de l'activitat



motora en ratolins YAC128. Tractaments posteriors, quan la patologia en les espines es detectada, també va ser eficaç.

Les nostres dades proporcionen una prova de concepte per a la silenciament de GluN3A com a estratègia beneficiosa per prevenir o revertir la desconnectivitat corticostriatal i la discapacitat motriu en HD i abonen l'ús de mètodes basats en ARNi o petites molècules per aprofitar aquest potencial terapèutic (*Molecular Therapy*, 2018 1 d'agost; 26 (8): 1965-1972).

### 3. Rellevància i possibles implicacions clíniques dels resultats obtinguts

Aquest projecte és un estudi preclínic que proporciona dades per dissenyar nous tractaments contra la malaltia de Huntington: (1) per a la senyalització del sistema BDNF / TrkB / p75, Pyk2 i PACAP, i (2) per a una nova diana terapèutica, la subunitat GluN3A dels receptors NMDA, que es va trobar recentment elevada en HD. Aquests resultats proporcionen informació important per al desenvolupament de teràpies dirigides no només a la malaltia de Huntington, sinó a altres trastorns cognitius, com ara la malaltia d'Alzheimer. La manca de tractaments efectius per a aquestes malalties té un gran impacte social i econòmic, així com problemes psicològics no només per als pacients, sinó també per a les seves famílies. Per tant, hi ha la necessitat de desenvolupar teràpies efectives per als trastorns neurodegeneratius i, en aquest escenari, els nostres resultats proporcionen informació per desenvolupar nous tractaments per millorar la qualitat de vida de la comunitat de la malaltia de Huntington.

### 4. Bibliografia científica generada

#### Publicacions

1. Montalban E, Al-Massadi O, Sancho-Balsells A, Brito V, de Pins B, Alberch J, Ginés S, Girault JA, Giralt A.

*Pyk2 in the amygdala modulates chronic stress sequelae via PSD-95-related micro-structural changes.*

**Transl Psychiatry.** 2019 Jan 15;9(1):3.

2. De Pins B, Cifuentes-Díaz C, Farah AT, López-Molina L, Montalban E, Sancho-Balsells A, López A, Ginés S, Delgado-García JM, Alberch J, Gruart A, Girault JA, Giralt A. *Conditional BDNF Delivery from Astrocytes Rescues Memory Deficits, Spine Density, and Synaptic Properties in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer Disease.*  
**J Neurosci.** 2019 Mar 27;39(13):2441-2458.
3. Creus-Muncunill J, Rué L, Alcalá-Vida R, Badillos-Rodríguez R, Romaní-Aumedes J, Marco S, Alberch J, Perez-Otaño I, Malagelada C, Pérez-Navarro E. *Increased Levels of Rictor Prevent Mutant Huntingtin-Induced Neuronal Degeneration.*  
**Mol Neurobiol.** 2018 Oct;55(10):7728-7742.
4. Marco S, Murillo A, Pérez-Otaño I. *RNAi-Based GluN3A Silencing Prevents and Reverses Disease Phenotypes Induced by Mutant huntingtin.*  
**Mol Ther.** 2018 Aug 1;26(8):1965-1972.
5. Cabezas-Llobet N, Camprubí S, García B, Alberch J, Xifró X. *Human alpha 1-antitrypsin protects neurons and glial cells against oxygen and glucose deprivation through inhibition of interleukins expression.*  
**Biochim Biophys Acta Gen Subj.** 2018 Sep;1862(9):1852-1861.
6. Saavedra A, García-Díaz Barriga G, Pérez-Navarro E, Alberch J. *Huntington's disease: novel therapeutic perspectives hanging in the balance.*  
**Expert Opin Ther Targets.** 2018 May;22(5):385-399.
7. Cabezas-Llobet N, Vidal-Sancho L, Masana M, Fournier A, Alberch J, Vaudry D, Xifró X. *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Enhances Hippocampal Synaptic Plasticity and Improves Memory Performance in Huntington's Disease.*  
**Mol Neurobiol.** 2018 Nov;55(11):8263-8277.
8. Giralt A, Brito V, Chevy Q, Simonnet C, Otsu Y, Cifuentes-Díaz C, De Pins B, Coura R, Alberch J, Ginés S, Poncer JC, Girault JA. *Pyk2 modulates hippocampal excitatory synapses and contributes to cognitive deficits in a Huntington's disease model.*  
**Nat Commun.** 2017 May 30;8:15592.

9. García-Díaz Barriga G, Giralt A, Anglada-Huguet M, Gaja-Capdevila N, Orlandi JG, Soriano J, Canals JM, Alberch J.  
*7,8-dihydroxyflavone ameliorates cognitive and motor deficits in a Huntington's disease mouse model through specific activation of the PLC $\gamma$ 1 pathway.*  
**Hum Mol Genet.** 2017 Aug 15;26(16):3144-3160.
10. Martín-Ibáñez R, Pardo M, Giralt A, Miguez A, Guardia I, Marion-Poll L, Herranz C, Esgleas M, Garcia- Díaz Barriga G, Edel MJ, Vicario-Abejón C, Alberch J, Girault JA, Chan S, Kastner P, Canals JM.  
*Helios expression coordinates the development of a subset of striatopallidal medium spiny neurons.* **Development.** 2017 Apr 15;144(8):1566-1577.
11. Mahfooz K, Marco S, Martínez-Turrillas R, Raja MK, Pérez-Otaño I, Wesseling JF.  
*GluN3A promotes NMDA spiking by enhancing synaptic transmission in Huntington's disease models.*  
**Neurobiol Dis.** 2016 Sep;93:47-56.
12. Pérez-Otaño I, Larsen RS, Wesseling JF.  
*Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS.*  
**Nat Rev Neurosci.** 2016 Oct;17(10):623-35.

### **Comunicacions a congressos**

28 en congressos nacionals i 19 en internacionals

### **Formació a investigadors:**

#### **Tesis doctorals:**

Alvaro Murillo (2019)

Sara Elena Fernández García (2019)

Alfonso Gerardo García Díaz-Barriga (2018)

Andrea Comella (2018)

Rafael Alcalá Vida (2017)

Marta Cherubini (2017)

**Treballs de Màster:**

Sara Conde Berriozábal (2018)

Esther Garcia-García (2018)

Ened Rodriguez Urgellés (2017)

Ekhine Arrieta (2015)