# Estudio del efecto de compuestos inhibidores de PDE7 y GSK3 en el desarrollo de un glioblastoma en un modelo de *Drosophila melanogaster*

Nermina Logo Lendo

Máster en Neurociencia

MÁSTERES DE LA UAM 2020-2021

Facultad de Medicina







# TRABAJO FIN DE MÁSTER

# Estudio del efecto de compuestos inhibidores de PDE7 y GSK3 en el desarrollo de un glioblastoma en un modelo de *Drosophila melanogaster*

Autor/a: Nermina Logo Lendo Director/a: Sergio Casas-Tintó Afiliación: Instituto Cajal Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo Avenida Doctor Arce, 37, 28002, Madrid

Madrid, 15 de junio, 2021







Sergio Casas-Tintó,

Instituto Cajal, Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo,

Avenida Doctor Arce, 37, 28008, Madrid

Como Director del Trabajo Fin de Máster titulado "Estudio del efecto de compuestos inhibidores de PDE y GSK3 en el desarrollo de un glioblastoma en un modelo de *Drosophila melanogaster*" que ha realizado bajo mi supervisión D. Nermina Logo Lendo como parte de sus trabajos para la obtención del Título de Máster en Neurociencia por la Universidad Autónoma de Madrid, DECLARO:

\_\_\_Que reúne los méritos suficientes para poder ser presentado y defendido públicamente.

Madrid, 9 de septiembre de 2021

Fdo.: S.C.T.

Abr	eviaturas	5
1.	RESUMEN	6
2.	ABSTRACT	6
3. INTRODUCCIÓN		
	3.1 Glioblastoma: clasificación, incidencia, prognosis y tratamiento	7
	3.2 Drosophila como modelo de estudio	9
	3.2.1 Ciclo vital de Drosophila melanogaster	
	3.2.2 Equivalencias del SNC en Drosophila	11
	3.2.3 Modelos de GB en <i>Drosophila</i>	12
	3.3 GB: bases genéticas y moleculares	13
	3.3.1 IDH	14
	3.3.2 P53	15
	3.3.3 MGMT	16
	3.3.4 PI3K	16
	3.3.5 EGFR	17
	3.4 PDE y GSK3 en GB	18
	3.4.1 Fosfodiesterasa (PDE)	
	3.4.2 Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3)	19
4.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
	5.1 Sistema de expresión UAS-GAL	23
	5.2 Cruces genéticos	24
	5.2.1 Estirpes Drosophila	24
	5.2.1 Balanceadores	25
	5.3 Compuestos	25
	5.4 Disección	30
	5.5 Inmunohistoquímica	31
	5.6 Toma de imágenes	31
	5.7 Análisis de imágenes	32
	5.8 Análisis estadísticos	33
6.	RESULTADOS	
	6.1 Calibrado de los compuestos	34
	6.2 Efecto de los inhibidores de GSK3 y PDE en cerebros con GB: contaje celula volumétrico	ar y 34
	6.2.1 Inhibidores duales de PDE7 y GSK3	

# ÍNDICE

	6.2.2 Inhibidores de PDE7	
	6.2.3 Inhibidores de GSK3	
	6.3 Reevaluación de las concentraciones de los compuestos	43
7.	DISCUSIÓN	
	7.1 Limitaciones	46
	7.2 Perspectivas futuras	48
8.	CONCLUSIONES	
9.	REFERENCIAS	51

# Abreviaturas

Abreviatura	Descripción	
Akt	Proteína quinasa B	
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico	
DAPI	4 ',6-diamidino-2-fenilindol	
DMSO	Dimetilsulfóxido	
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal growth	
	factor receptor)	
GB	Glioblastoma	
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3	
IDH	Isocitrato deshidrogenasa	
MGMT	Metil guanina metil transferasa	
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero	
OMS	Organización Mundial de la Salud	
PDE	Fosfodiesterasa	
PDK	Piruvato deshidrogenasa quinasa	
РІЗК	Fosfoinositol 3-quinasa (Phosphoinositide 3-kinase)	
PIP2/3	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato / trifosfato	
РКА	Proteína quinasa A	
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa	
RFP / RFP-myr	Proteína fluorescente roja / Proteína fluorescente roja miristoilada	
RTK	Receptor tirosina quinasa	

#### 1. **RESUMEN**

Los gliomas son los tumores primarios más prevalentes del sistema nervioso central que se desarrollan a partir de células gliales neoplásicas. Entre ellos, el glioblastoma (GB) es el más frecuente y agresivo, con mal pronóstico y una esperanza de vida tras el diagnóstico de 15 meses. En los últimos años se ha ampliado el estudio sobre las bases genéticas y moleculares que atañen el desarrollo de los GBs. Las mutaciones más frecuentes afectan a las vías de PI3K y EGFR. Dos de los efectores más relacionados con el crecimiento de los GB son PDE y GSK3 y su expresión se encuentra aumentada en el GB. Estudios anteriores observaron que la inhibición de estos efectores mostraba resultados prometedores en la progresión del GB. En este trabajo se ha utilizado un modelo de GB en Drosophila melanogaster para evaluar la eficacia de compuestos que inhiben GSK3 y PDE. Se analizó el número de células gliales, así como el volumen de la membrana glial en cerebros de larva con GB tratados. Los resultados obtenidos muestran tendencias en la reducción del GB en determinados compuestos, destacando VP3.15, un inhibidor dual de GSK3 y PDE, que muestra resultados significativos en esta inhibición del desarrollo del tumor. Como futuras propuestas en la línea de este trabajo, sería interesante analizar más a detalle las dianas de estos compuestos y replicar esta búsqueda sistemática en modelos de cultivo celular y xenograft.

#### 2. ABSTRACT

Gliomas are the most prevalent primary brain tumors that developed from neoplastic glial cells. Among them, glioblastoma (GB) is the most frequent and aggressive, with a poor prognosis and a life expectancy of 15 months after the diagnosis. In the recent years, the study of the genetic and molecular bases that affect the development of GBs has been expanded. The main pathways involved in the development of these tumors are PI3K and EGFR. PDE and GSK3 are two of the most related effectors to the growth of GB, and their expression is increased in this pathology. Previous studies observed that inhibition of these effectors showed promising results in reducing the development of GB. In this work we used a *Drosophila melanogaster* model of GB to verify the efficacy of compounds that inhibit GSK3 and PDE. We analyzed glial cell number, as well as glial membrane volume in larval brains in treated and untreated GB samples. The results show trends in the reduction of GB in certain compounds, highlighting VP3.15, a dual inhibitor of GSK3 and PDE, which shows a significant reduction of the tumor progression. Some of the future proposals in this line of work are to analyze in more detail the targets of these compounds, and to replicate this screening in cell culture and xenograft models.

# **Palabras clave**: *Drosophila*; glioblastoma GB; glía; membrana glial; PDE; GSK3; PI3K/Akt/mTOR; EGFR

# 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Glioblastoma: clasificación, incidencia, prognosis y tratamiento

El glioblastoma (GB) es el tumor cerebral maligno primario más común en humanos (Ostrom et al., 2015). Su incidencia es de 3.2 casos cada 100.000 personas y la media de edad de diagnóstico son 64 años (Davis, 2016). Es un tipo de cáncer incurable, con una media de supervivencia de 15 meses con un tratamiento adecuado y de 3 meses si no se aplica ninguno (Thakkar et al., 2014).

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) se pueden clasificar en función del tipo celular al que afectan, de si son benignos o malignos, del origen del tumor y, finalmente, de su localización (focales o difusos).

Los tumores benignos tienden a crecer de forma lenta y no difunden por el tejido, mientras que los malignos son cancerosos, crecen rápidamente, invaden el tejido sano, difunden y destruyen otros tejidos. En el caso del GB, éste está formado por astrocitos neoplásicos mal diferenciados que difunden y tienen una propensión a infiltrarse en el resto del tejido cerebral sano (Furnari et al., 2007).

En función de su origen pueden ser primarios o secundarios, afectando los primeros principalmente a población de mayor edad, mientras que los secundarios se encuentran principalmente en pacientes más jóvenes (Furnari et al., 2007).

La Organización Mundial de la Salud llevó a cabo una clasificación en función de la gravedad de los tumores primarios del sistema nervioso central (TPSNC). Se basa en la célula de origen del proceso tumoral, así como las características morfológicas que se asocian al pronóstico:

- OMS Grado I: tumores circunscritos, de lento crecimiento y bajo potencial de conversión a un tumor de mayor malignidad.
- OMS Grado II: tumores de borde difuso, lento crecimiento y, algunos, con tendencia a progresar a tumores de mayor malignidad.
- OMS Grado III: tumores infiltrantes con células atípicas o anaplásicas y mayor número de mitosis.
- OMS Grado IV: tumores de rápido crecimiento con alta tasa mitótica, pudiendo presentar vasos de neoformación y áreas de necrosis.

Ésta clasificación tienes implicaciones terapéuticas, ya que, por ejemplo, las lesiones OMS de Grado I pueden ser extirpadas en su totalidad a través de cirugía; mientras que en las lesiones

infiltrantes (Grado II, III y IV), esta extracción puede ser incompleta y, por lo tanto, requerir tratamientos oncológicos (radioterapia y quimioterapia) (Sinning, 2017).

En referencia a sus características histopatológicas, la necrosis y proliferación microvascular que produce el GB le otorgan el grado IV, el más alto en la clasificación de gravedad de la OMS. Estos tumores cursan con anaplasia, alta tasa mitótica, e invansividad, aunque estas características no son únicas de los GBs, ni por ellas se les asignaría el grado IV (Wirsching et al., 2016). Otra de las características remarcables de este tipo de tumores es su heterogeneidad celular dentro del propio tumor, con subtipos tumorales distintivos, lo que implica una dificultad en el adecuado funcionamiento de los tratamientos específicos (Brandes et al., 2008; Segura-Collar et al., 2020; Majewska et al., 2017).

La última clasificación realizada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) se basa en los parámetros moleculares y genéticos, además de los histológicos utilizados en su versión anterior. Actualmente los GBs forman parte del grupo de "gliomas difusos", que incluye tanto los astrociticos como los oligodendrogliales. Los divide en: 1) GB, IDH-*wildtype*; 2) GB, IDH-mutante; y 3) GB, NOS (*Not Otherwise Specified*). El primero de ellos abarca el 90% de todos los casos de GB, además de corresponderse con la tipología clínica de "GB primario" y se diagnostica principalmente en pacientes mayores (+55 años). El GB, IDH-mutante, por su parte, conforma sólo el 10% de los diagnósticos de GB y se corresponde a la tipología de "GB secundario", diagnosticado principalmente en personas más jóvenes. Finalmente, el tercer tipo corresponde a aquellos tumores cuya evaluación de IDH no puede ser realizada. (Louis et al., 2016)

Además de la clasificación de la OMS, *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) divide los GBs en función de su perfil de expresión génica en cuatro subtipos: proneural, neural, clásico y mesenquimal (Davis, 2016; Soomro et al., 2017; Verhaak et al., 2010). Los GB proneurales tienen características de células oligodendrogliales y su incidencia es menor, apareciendo en pacientes más jóvenes con un GB secundario. El tipo neural surge de los astrocitos, así como de células de linaje de oligodendrocitos y expresa genes relacionados con neuronas. Su característica más prominente es su alto nivel de EGFR (*epidermal growth factor receptors*) y una forma de expresión similar a la del tejido cerebral sano. Los marcadores que expresan los GB de la tipología clásica son de precursores celulares y células madre y tienen características de astrocito, mientras que el tipo mesenquimal comparte características de gliomas astrocíticos de cultivo (Soomro et al., 2017).

Debido a la complejidad del tumor, su tratamiento es extremadamente dificultoso. Actualmente el tratamiento estándar es la resección quirúrgica de la zona afectada, acompañada de sesiones

de radioterapia y quimioterapia con el fármaco temozolomida (TMZ) (Kovaleva et al., 2019; Davis, 2016). Por su elevado grado de infiltración las cirugías de resección terminan no siendo curativas y el tumor resurge o progresa. Tal es la dificultad del tratamiento que en ocasiones el planteamiento inicial es la cura paliativa (Davis, 2016).

#### 3.2 Drosophila como modelo de estudio

*Drosophila* como modelo animal de laboratorio empezó a usarse en 1910 y desde entonces ha contribuido ampliamente al avance del conocimiento científico, lo que le confiere la categoría de buen modelo de estudio en biología. En primer lugar, hay una extensa homología entre humanos y *Drosophila* tanto a nivel celular como genético ya que un 75% de genes asociados a enfermedades de humanos, tienen un ortólogo en mosca (Chen et al., 2019).

En humanos encontramos grandes familias de genes que intervienen en funciones similares, en cambio en *Drosophila* el número de genes es menor y no existe redundancia génica. De este modo, se simplifican los estudios de pérdida de función para modelizar y entender el funcionamiento de genes relevantes para enfermedades. En consecuencia, se necesita modular menos genes para reproducir las condiciones patológicas propicias y llevar a cabo experimentos para testar la actividad terapéutica de compuestos (Su, 2019).

Utilizar *Drosophila* en el estudio para cáncer tienes numerosas ventajas respecto a otros modelos clásicos, como podría ser el modelo murino del ratón o de la rata. Entre estas ventajas está el hecho de que su ciclo de vida es corto, su descendencia es extensa, tiene un genoma completamente secuenciado y un gran abanico de herramientas genéticas con las que trabajar. Entre estas herramientas encontramos el sistema UAS-Gal4, un extenso catálogo de ARNi para casi todos los genes que componen su genoma y herramientas para la mutagénesis dirigida o de inserción (Chen et al., 2019). Además de contar con múltiples herramientas genómicas, *Drosophila* es un organismo multicelular complejo con características biológicas y fisiológicas conservadas que son relevantes para modelizar procesos patológicos humanos (Pandey et al., 2011).

En cuanto a la modelización de enfermedades neurológicas, las equivalencias celulares entre humanos y *Drosophila* permiten desarrollar este tipo de enfermedades en el modelo de forma adecuada. La homología entre mosca y humanos los encontramos tanto a nivel celular como, parcialmente a nivel morfológico en el SNC (se explicará más adelante – apartado 3.2.2) (Chen et al., 2019). Los cerebros de mosca adulta cuentan con circuitos neuronales intrincados que median comportamientos complejos como los ritmos circadianos, sueño, aprendizaje y memoria, cortejo, alimentación, agresión, acicalado, etc. (Pandey et al., 2011). En

investigaciones neuropatológicas en humanos se utiliza principalmente tejido post-mortem, por lo que los modelos animales como el de *Drosophila* son una buena alternativa complementaria para este tipo de estudios (Pandey et al., 2011).

Inicialmente, para el desarrollo de nuevos fármacos era necesario identificar proteínas implicadas en enfermedades humanas y, posteriormente, buscar un compuesto químico que pudiera alterar la función de estas proteínas haciendo pruebas con un extenso número de compuestos químicos, optimizándolos y testándolos en modelos animales (Pandey et al., 2011). Los modelos de enfermedades humanas en *Drosophila* contribuyen al desarrollo de estas drogas de forma eficaz por su alto rendimiento en el testeo de los compuestos específicos para trastornos específicos, y el alto grado de conservación funcional con humanos.

En este caso en concreto el modelo de *Drosophila* nos permite reproducir de forma genética el GB, de este modo es posible seguir la evolución de dicho tumor desde el nacimiento del animal hasta la muerte y estudiar las fases de desarrollo a lo largo del ciclo de vida de la mosca.

## 3.2.1 Ciclo vital de Drosophila melanogaster

Como se ha comentado anteriormente, una de las principales ventajas del modelo de *Drosophila* es su corto ciclo de vida. Bajo condiciones estándar de laboratorio, a 25°C, el ciclo de vida de *Drosophila* dura 10 días desde la fertilización hasta la adultez. Este ciclo se puede dividir en diferentes fases:

- 1. **Embriogénesis**: es un proceso rápido que se completa a las 24 horas después de la fertilización. El embrión queda depositado en la comida (papilla).
- 2. Estado larval: 1 día después de la deposición de los huevos en la comida, éstos pasan al primer estado larvario. La larva empieza a alimentarse por sí misma. 24 horas más tarde pasan al segundo estado larvario y 48 horas después al tercer estado larvario. Durante todos estos se produce un crecimiento constante de las crías. Hacia el final del tercer estado larvario (alrededor de 5 días después de la puesta de huevos) la larva deja de alimentarse y sale de la papilla (etapa errante) para buscar un sitio seco y pupar.
- Etapa pupal: encapsulación al final del tercer estadio larvario, con una duración de unos 4 días. Muchas estructuras son destruidas, mientras que otras se van formando (muchas de ellas a partir de los discos imaginales).
- 4. Adultos: emergen después de la eclosión de las pupas. La duración de la vida de estas moscas es de alrededor de 30 días, pero varía en función de la temperatura. El tamaño de las moscas hembra al nacer es algo mayor al de los machos y están preparadas para

la reproducción 12 horas después de haber eclosionado, aunque su pico de fertilidad se produce entre el día 4 y 15 tras su eclosión.



("Drosophila life cycle and fly anatomy | Cherry Biotech", 2021), (Stocker et al., 2008).

Figura 1: Imagen ilustrativa del ciclo vital de Drosophila melanogaster

#### 3.2.2 Equivalencias del SNC en Drosophila

A nivel morfológico nos encontramos que tanto *Drosophila* como los humanos cuentan con un cerebro simétrico que consta de dos lóbulos y además ambos comparten la existencia de una estructura equivalente, la médula espinal en humanos y el ganglio ventral en las moscas.

Las funciones de la glía en *Drosophila* están conservadas aunque la clasificación de estas células sea diferente. Durante el desarrollo realizan tareas de guía axonal, eliminación de sinapsis para la refinación de circuitos y forman la barrera hematoencefálica (BHE). Una vez formado el sistema nervioso regulan sinapsis (reciclando glutamato), modulan la permeabilidad de la BHE y dan soporte trófico a las neuronas (Losada-Pérez et al., 2020).

*Drosophila* cuenta con 4 tipos de células gliales: glía de la línea media, glía del neuropilo, glía del córtex y glía de la superficie. La primera se encarga de guiar los axones durante el desarrollo (parecido a la función que realiza la glía radial en humanos). La glía del neuropilo tiene funciones equivalentes a las de los astrocitos, oligodendrocitos y precursores de los oligodendrocitos humanos; se dividen en glía envolvente y glía "*astrocyte-like*". La glía del córtex provee soporte trófico a las neuronas, rodea los cuerpos neuronales y es de gran

importancia durante el desarrollo, aportando apoyo metabólico. Finalmente, la glía de la superficie cubre el SNC y sistema nervioso periférico (SNP), comparte características con astrocitos y células de Scwhann (Losada-Pérez et al., 2020).

# 3.2.3 Modelos de GB en Drosophila

Existen diversas formas de replicar los GBs en el modelo de Drosophila, algunos de ellos son:

A. Coexpresión de formas constitutivamente activas de EGFR y PI3K. Utilizando la herramienta UAS-GAL4 es posible reproducir el tumor (Read et al., 2009). Este modelo recapitula la progresión, migración e invasión de las células tumorales en el cerebro de *Drosophila*. Se utiliza in vivo para estudiar las bases genéticas y moleculares de la enfermedad (Losada-Pérez et al., 2020). Este modelo es el que se utiliza en el actual trabajo.



*Figura 2*: Imágenes comparativas de un cerebro sano de *Drosophila* y un cerebro con GB. Imagen A: cerebro control sin GB; Imagen B: cerebro de *Drosophila* con un GB desarrollado. En la segunda imagen se puede apreciar el crecimiento de los lóbulos y el aumento de células gliales en comparación con la imagen control. Marcado en rojo (RFP) la membrana glial, y en verde (Repo) los núcleos de las células de la glía.

B. Regulación a la baja de PTEN con una forma constitutivamente activa de Ras. Tanto PTEN como Ras son objetivos aguas abajo de PI3K y EGFR, de modo que la modificación de ambos produce una neoplasia comparable a la que encontramos en los GBs humanos (Losada-Pérez et al., 2020).

Pese a ser buenos modelos de estudio del GB, tienen ciertas limitaciones. En función de la región reguladora (*"enhancer"*) utilizada para expresar los genes inductores del GB, puede variar el número de células afectado. Habitualmente se utiliza el *enhancer* "Repo", que dirige la

expresión de los genes de interés a las células gliales y sus precursores. Debido a que el *enhancer* Repo dirige la expresión de genes indistintamente a todas las células gliales, es difícil estudiar la progresión de una célula tumoral por expansión clonal, o las etapas iniciales del desarrollo del GB. En cambio, el uso de Repo permite reproducir las características del frente difuso e infiltrativo del GB y la relación entre las células del GB y el tejido sano circundante (Losada-Pérez et al., 2020).

- C. Ruta p53: esta vía está afectada habitualmente en los pacientes con GB, pero en *Drosophila* las funciones de p53 no están del todo conservadas. Se intentó generar un modelo expresando las mutaciones de p53 más habituales que encontramos en humanos pero no se desarrollaron transformaciones neoplásicas (Losada-Pérez et al., 2020).
- D. Expresión de FGFR3 (receptor 3 del factor de crecimiento de los fibroblastos)-TACC3 ("Transforming acidic coiled coil-containing protein 3"): produce una proteína quimérica hiperfosforilada con un dominio quinasa constitutivamente activado que tiene un efecto oncogénico en vivo (Losada-Pérez et al., 2020).

Para el estudio de la recidiva de los tumores secundarios después del tratamiento es necesario generar un modelo específico. Un ejemplo es la amplificación del receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y sus ligandos, comunes en GB tratado. El aumento de la expresión de la forma constitutivamente activa de *pvr* (homólogo de PDGFR humano) en la glía, causa migraciones aberrantes de las células gliales a los discos imaginales y muerte por la expresión de tetraspanin 2A (tsp2A). Tsp2A es homólogo de CD9 (en humanos), encontrado en la mayor parte de muestras humanas de GB (Losada-Pérez et al., 2020).

#### 3.3 **GB: bases genéticas y moleculares**

La aparición de GBs se debe a diferentes alteraciones genéticas en diversas rutas que controlan la proliferación celular, supervivencia celular (apoptosis y necrosis), invasión y angiogénesis (Furnari et al., 2007).

Encontramos diferentes problemas en cuanto a la proliferación y senescencia de las células en los gliomas debido a mutaciones en los genes reguladores del ciclo celular. La inactivación de rutas que preservan la regulación del ciclo celular hace que estas células sean especialmente susceptibles a divisiones celulares inapropiadas causadas por formas constitutivamente activas de efectores de señalización mitogénica, como es la fosfoinostidina3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Furnari et al., 2007).

Aunque las bases genéticas son heterogéneas, las alteraciones más comunes que se producen en los GBs incluyen amplificaciones genómicas, mutaciones activadoras y sobreexpresión de receptores de tirosina-quinasa (RTK – receptor tyrosine kinases), como EGFR, PDGFRA (receptor A del factor de crecimiento derivado de plaquetas) y FGFR (receptor del factor de crecimiento fibroblástico) y genes de rutas de tansducción de señal de RTK, como PI3K. La mayoría las alteraciones se encuentran en las vías PI3k (89,6%). Más concretamente EGFR (57%) y PI3K (25%) se encuentran amplificadas o mutadas. PTEN, una vía supresora, también está afectada en el 41% de los casos (Losada-Pérez et al., 2020). Otras mutaciones que podemos encontrar son las de los genes IDH (1 y 2), que generan GBs con un pronóstico clínico más favorable que aquellos que son *wildtype* (silvestre). En contraste a lo que pasa con los genes IDH, las alteraciones en EGFR implican un grado mayor de malignidad, propiciando la supervivencia de las células tumorales y aumentando su capacidad proliferativa, angiogénica e invasiva. En la ruta de p53 también encontramos mutaciones, las cuales evitan el normal funcionamiento de sus capacidades supresoras tumorales (Segura-Collar et al., 2020).



*Figura 1*: Esquema de las vías que se encuentran alteradas en el desarrollo de un GB. Extraído de Read et al., 2011.

#### 3.3.1 <u>IDH</u>

La enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) participa en la catalización del oncometabolito 2hidroxiglutarato. Este oncometabolito actúa impidiendo la regulación epigenética y aumenta la hipoxia (Sim et al., 2018). La familia del gen IDH tiene tres isomerasas, IDH1, IDH2 e IDH3. La mutación de este gen produce cambios epigenéticos que repercuten en el perfil de expresión y la inactivación de supresores tumorales (Soomro et al., 2017). Las mutaciones en el gen IDH (IDH-mutado) se observan en, aproximadamente, un 5-10% de todos los casos de GB. Estas mutaciones se asocian con edades más tempranas, así como mejor pronóstico (Wirsching et al., 2016). Entre éstas, encontramos en mayor proporción la de IDH1, descrita en un 90% de los casos; mientras que las mutaciones en IDH2 representan sólo un 10% (Soomro et al., 2017). Por otro lado, el GB IDH-*wildtype* se asocia a edades más tardías y a un peor pronóstico. Mutaciones en el promotor TERT (telomerasa transcriptasa inversa) son las alteraciones moleculares más frecuentes en el GB IDH-*wildtype*. Éstas implican un aumento en la trasncripción de TERT y un aumento en su actividad, inmortalizando células tumorales (Le Rhun et al., 2019). Estas mutaciones en TERT (telomerasa transcriptasa inversa) se asocian con un pronóstico especialmente malo en este tipo de pacientes (Wirsching et al., 2016). Este promotor se relaciona con el mantenimiento de los telómeros, esencial para las células que están en crecimiento activo y sus mutaciones se correlacionan con alteraciones en *EGFR* (amplificaciones) y *IDH* y *TP53*, aunque con los dos últimos esta correlación es inversa (Thakkar et al., 2014).

#### 3.3.2 <u>P53</u>

Las alteraciones que se producen en p53 son un sello distintivo del cáncer y se dan de forma prematura en los GBs (Maher, 2001, Segura-Collar et al., 2020). La proteína p53 tiene funciones anti-tumorales que quedan abolidas cuando se producen mutaciones en su gen. Estas mutaciones, además, dotan a esta proteína de otras funciones oncogénicas (Segura-Collar et al., 2020). Estas mutaciones en p53 se han encontrado en aproximadamente un 60% de los pacientes con GB secundario, y en un 25% de pacientes con GB primario (Chaurasia et al., 2016).

La función principal de p53 es la prevención de la propagación de células con genomas inestables a través de la detención del ciclo celular en la fase G1 o iniciando la apoptosis o arresto proliferativo. La ruta de p53 está alterada en la mayoría de los gliomas esporádicos. Se producen pérdidas de *TP53* ya sea a través de mutaciones que impiden la unión del ácido desoxirribonucleico (ADN) o la pérdida del cromosoma 17p (Furnari et al., 2007). Una de las ganancias de función de esta proteína es aumentar el reciclaje de varios receptores a la membrana plasmática, aumentando la activación de señales aguas abajo; esta función se ha relacionado con diferentes receptores de membrana, como por ejemplo EGFR (Segura-Collar et al., 2020).

Aquellos gliomas que tienen mutaciones en *TP53* son menos agresivos que los "*p53-wild-type*". En este tipo de gliomas encontramos diversos genes alterados relacionados con el tráfico vesicular. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio encontraron que la regulación a la baja del gen *Kish* (ortólogo en *Drosophila* de *TMEM167A*) en los GBs con p53 "*wild-type*" impedía la progresión del tumor (Portela et al., 2018). Los tumores que tienen la variante *"wild-type"* de p53 acumulan alteraciones en EGFR, produciendo una mayor actividad de este receptor que propicia la supervivencia de las células tumorales. Por otro lado, los tumores p53mutantes no parecen modificar su curso con la inhibición de *Kish*, por lo que se ha postulado que las mutaciones en p53 aportan rutas de señalización alternativas a la función de Kish/TMEM167A (Segura-Collar et al., 2020).

#### 3.3.3 <u>MGMT</u>

Es una enzima localizada en el núcleo de las células que se encarga de la reparación ADN. Cuando se producen daños en el ADN, esta enzima se transfiere al núcleo y se une a O6-metilguanina para reparar de forma efectiva el ADN. Al mismo tiempo que se produce esta reparación, la propia enzima se desactiva de forma irreversible ("enzima suicida") (Soomro et al., 2017).

Cuando se producen metilaciones en el promotor del gen de MGMT, se inhibe la transcripción de varios genes como consecuencia, resultando en la inactivación de genes de supresores tumorales, genes reparadores de ADN y genes proapoptóticos; induciendo la carcinogénesis (Soomro et al., 2017).

El 50% de estas metilaciones del promotor de MGMT se producen en GBs secundarios. Este tipo de metilaciones son sensibles a quimioterapia (Soomro et al., 2017).

#### 3.3.4 <u>PI3K</u>

La ruta de PI3K/Akt/mTOR está activada en casi el 90% de GBs diagnosticados. Esta vía participa en la regulación de la movilidad de células de glioma diferenciadas, así como en la supervivencia y proliferación de las mismas (Langhans et al., 2017, Read et al., 2011). Además, algunos efectores de PI3K, como las Akt quinasas, suelen estar constitutivamente activadas o amplificadas en los GBs (Read et al., 2011 y 2009). Estas modificaciones de la vía de PI3K se producen principalmente a través de alteraciones en PTEN y Akt (Le Rhun et al., 2019).

PI3K activa la proteína Akt (Yang et al., 2020) a través de la generación del segundo mensajero PIP3. Esta activación de Akt estimula la progresión del ciclo celular e inhibe la apoptosis, promoviendo el crecimiento celular (Shahcheraghi et al., 2020). Akt media en la iniciación de la señalización de la vía mTOR, relacionada también con el crecimiento celular. Por lo que se puede concluir que Akt participa activamente en la proliferación tumoral (Li et al., 2016).

Por otro lado, PTEN es un miembro de la familia de tirosina fosfatasa. Es un gen supresor de tumores que realiza dicha función a través de la fosforilación de proteínas. PTEN puede inhibir la invasión celular, adherencia celular a la matriz circundante y la formación de vasos

sanguíneos. También se relaciona con la señalización de las rutas de transducción. Cuando se produce un exceso de diferenciación celular, puede regular el ciclo celular e inducir apoptosis, inhibiendo, de este modo, el crecimiento tumoral. Aproximadamente un 86% de los pacientes con GB tienen pérdida de función del gen PTEN (Le Rhun et al., 2019) y cambios la ruta de señalización del receptor de tirosina quinasa / fosfoinostidina 3-quinasa (RTK/PI3K) (Soomro et al., 2017). Esta pérdida de PTEN, que antagoniza la vía de señalización de PI3K, se puede dar por mutaciones puntuales, deleciones y silenciamiento epigenético e implica la activación constitutiva de PI3K debido a los niveles elevados de PIP3 (Chen et al., 2019; Portela et al., 2020).

En conclusión, la vía de PI3K/Akt/mTOR tiene diversos componentes que participan en la modulación del crecimiento de los tumores. Su mal funcionamiento produce un aumento en la fosforilación de Akt, que produce una mayor proliferación tumoral. Finalmente, la pérdida de función de PTEN evita la inhibición de la vía Akt, perdiendo sus propiedades antitumorales.





#### 3.3.5 <u>EGFR</u>

El gen de *EGFR* codifica un receptor transmembrana de tirosina-quinasa. Cuando el ligando se une a este receptor, EGFR se fosforila, y promueve el crecimiento, migración y supervivencia celular (Thakkar et al., 2014; Soomro et al., 2017). La señalización de este receptor promueve la

división celular, invasividad tumoral y resistencia a radioterapia y quimioterapia. La actividad de EGFR se puede aumentar por la regulación al alza de la expresión de *EGFR*, inhibición o eliminación de vías inhibitorias, la aparición de formas constitutivamente activas de EGFR y amplificación de EGFR (Thakkar et al., 2014). Esta última tiene una alta incidencia en gliomas (40-50% de todos los GB) (Soomro et al., 2017). La alteración del gen de EGFR resulta en mutaciones diversas; de entre ellas, la sobreexpresión de EGFRvIII, una versión constitutivamente activa del receptor que se genera por la eliminación del dominio de unión del ligando. La activación constitutiva de estos receptores a través de amplificaciones o mutaciones de los genes de los mismos contribuyen, a través de la estimulación crónica de la señalización de Ras, a la proliferación, migración y resistencia a apoptosis de las células tumorales (Chen et al., 2019; Portela et al., 2020). Esta mutación es un indicador de mal pronóstico en pacientes con este tipo de tumores (Thakkar et al., 2014; Soomro et al., 2017).

## 3.4 PDE y GSK3 en GB

#### 3.4.1 Fosfodiesterasa (PDE)

Las PDE son una subfamilia de ectonucleotidasas, de las cuales los mamíferos tienen 11 isoformas codificadas por 21 genes diferentes. Cada una de estas isoformas tiene diferentes afinidades con AMPc. Las PDE generan gradientes intracelulares y microdominios de estos segundos mensajeros para regular su señalización espacio-temporal a través de la metabolización de AMPc y GMPc (Safitri et al., 2020).

Estudios comparativos de los tumores cerebrales, muestran niveles bajos de AMPc en comparación con tejido de cerebros sanos. Aunque todavía no se conoce exactamente los mecanismos moleculares de AMPc, niveles altos intracelulares de este segundo mensajero se relacionan con la muerte de células cancerígenas (Safitri et al., 2020). En ensayos con inhibidores no específicos de PDE en cultivos celulares realizados en células tumorales de glioblastoma (A172 y U87MG) mostraron una disminución en la supervivencia de este tipo de células (Moon et al., 2012). Por ese motivo los inhibidores de PDE son una buena propuesta de terapia para pacientes con GB.

Dependiendo del tipo de célula en el que encontremos funcionamientos defectuosos de AMPc, éste juega un papel diferente promoviendo o reprimiendo la proliferación celular. En el caso del GB produce una supresión de la proliferación celular (Safitri et al., 2020).

La sobreexpresión de PDE específicas se ha relacionado con patrones alterados de AMPc en el cerebro (PDE1, PDE4, PDE5 y PDE7). En trabajos relacionados, se ha observado que la inhibición de algunas PDE puede reducir la proliferación de determinados cánceres a través del aumento de AMPc y la inducción de apoptosis. Se produciría una potenciación de las vías de

señalización de AMPc/PKA (efector aguas abajo de AMPc) a través del secuestro no selectivo de PDE y, como consecuencia, una reducción del crecimiento celular. Esto sugiere que la inhibición de algunas fosfodiesterasas podría ser una terapia viable para el tratamiento del cáncer. (Safitri et al., 2020).

Investigaciones sobre la *PDE7B* demostraron que un aumento en la expresión de este gen correlacionaba negativamente con la supervivencia en los pacientes. La sobreexpresión en cultivos de células de GB resultó en un aumento del crecimiento y agresividad del tumor (Brooks et al., 2014).

Otros autores encontraron que PDE5 se expresa de forma significativa en células cancerosas. El aumento en los niveles de PDE5 correlaciona con una mayor supervivencia de los pacientes. También se ha descrito en cultivo celular la relación entre la sobreexpresión de PDE5 y la inhibición de la invasvidad, movilidad y reparación de ADN, que implican una mayor supervivencia de las células cancerígenas (Cesarini et al., 2017). Por lo tanto, es necesaria una aproximación experimental más detallada para conocer el papel de las diferentes PDEs en la progresión del GB.

En cuanto a *Drosophila*, encontramos cinco genes que codifican fosfodiesterasas: *PDE1c*, *PDE4* (*dunce*), *PDE6*, *PDE8*, *PDE9* y *PDE11*. Todos ellos excepto la fosfodiesterasa 9 actúan regulando AMPc y GMPc. *PDE9* codifica una fosfodiesterasa que está involucrada en la neurogénesis («FlyBase Gene Report: Dmel\Pde1c», 2021; «FlyBase Gene Report: Dmel\Pde6», 2021; «FlyBase Gene Report: Dmel\Pde8», 2021; «FlyBase Gene Report: Dmel\Pde11», 2021). Esta regularización de AMPc y GMPc también se produce por parte de las fosfodiesterasas en humanos. Estudios anteriores en *Drosophila* han observado que PDE1, PDE6 y PDE11 mostraban sensibilidad a algunos inhibidores de PDE de vertebrados. En este mismo estudio realizaron una caracterización de las PDE en humanos y *Drosophila* (Day et al., 2005).

#### 3.4.2 Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3)

GSK3 es una proteína quinasa que participa en la fosforilación de residuos de serina y treonina en múltiples vías, habitualmente inhibiendo sus dianas aguas abajo (Beurel et al., 2015). Tiene funciones diversas en el crecimiento y la diferenciación celular. En mamíferos GSK3 tiene dos isoformas, la alfa y la beta. Se trata de una proteína constitutivamente activa, inactivada habitualmente por hormonas y otras moléculas que participan en sus vías de señalización (Abdul et al., 2017). GSK3 juega un papel central en diversas enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamatorias, cáncer, etc. (Beurel et al., 2015) y tiene un papel relevante en el desarrollo oncogénico de diversos tumores. En el caso de los GBs, la evidencia indica que GSK3 (específicamente GSK3 $\beta$ ) desarrolla funciones pro-tumorales (Zhou et al., 2016).

Akt es una quinasa que requiere de una doble regulación para activarse: translocación a la membrana plasmática y fosforilación. Akt contiene un dominio con alta afinidad a PIP3, que ocasiona la translocación. PIP3 es catalizado por PI3K, por lo que éste último es esencial para la translocación de Akt. La formación de PIP3 resulta, también, en la translocación a la membrana y activación de PDK (quinasa dependiente de fosfatidilinositol). PDK1 fosforila a Akt en Thr308, lo que es necesario y suficiente para la activación de Akt. PTEN inhibe la fosforilación de Akt a través de la desfosforilación de PIP3 a PIP2 (Majewska et al., 2017).

Altos niveles de Akt fosforilada se relacionan con un peor pronóstico en GB. La amplificación y/o sobreexpresión de EGFR conlleva la activación de PI3K/Akt en estos tumores, por lo que la inhibición de la ruta PI3K/Akt/mTOR se ha propuesto como estrategia terapéutica (Majewska et al., 2017).

El principal regulador de Akt es PTEN, que habitualmente está inactivo en los GB por mutaciones genéticas o metilaciones, implicando un incremento en los niveles de PIP3 y una actividad elevada de Akt (Majewska et al., 2017).

GSK3 $\beta$  tiene diferentes regiones de fosforilación que producen la activación o inactivación de la proteína. El sitio de fosforilación de Akt es la Ser9 y produce la inactivación de GSK3 $\beta$ . Esta fosforilación es propiciada por la estimulación de insulina. Por otro lado, la autofosforilación o fosforilación por otras tirosina quinasas en Tyr216 aumenta la actividad catalítica de GSK3 $\beta$ . Los niveles de GSK3 $\beta$  y GSK3 $\beta$  fosforilada en Tyr216 están aumentados en GB comparándolo con cerebros sanos. Esta proteína modula la actividad de la  $\beta$ -catenina, que se transloca al núcleo activando genes relacionados con la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis (Majewska et al., 2017).

GSK3β también regula la actividad de NF-κB (*nuclear factor-kappa B*), que controla la transcripción del ADN y actúa como un factor de supervivencia. A su vez, GSK3β fosforila c-MYC, un factor de transcripción relacionado con la regulación del crecimiento celular y proliferación (Majewska et al., 2017).

En cuanto a *Drosophila*, encontramos un ortólogo de este gen (*GSK3*), denominado *shaggy* (*sgg*). Se localiza en el cromosoma X en el locus NC\_004354.4 («FlyBase Gene Report: Dmel\sgg», 2021). La proteína que codifica este gen es una serina/treonina quinasa necesaria para la regulación de diversos procesos del desarrollo de la larva y los discos imaginales. Las funciones de esta proteína se encuentran altamente preservadas entre mamíferos y *Drosophila*.

Del mismo modo que en GSK3 en humanos, Sgg es inactivada por la fosforilación que produce la insulina (Papadopoulou, 2004). Este gen codifica 10 isoformas de la proteína diferentes. La forma corta de esta proteína (Sgg-PB) se expresa durante la embriogénesis y es esencial para la viabilidad del animal, mientras que la forma larga (Sgg-PA) se expresa específicamente en el sistema nervioso en desarrollo y no es necesaria para la viabilidad. La complejidad de la expresión de *Sgg* refleja diferentes funcionalidades en la expresión espaciotemporal de GSK-3 (Korona, et al. 2020).

En anteriores trabajos (Trostnikov et al., 2020) se observó la relación entre la modulación de GSK3 en diferentes tipos celulares y la *esperanza de vida*. Encontraron que la sobreexpresión ubicua de *sgg* reducía la esperanza de vida y la disminución de la expresión de este gen a través de ARNi incrementaba la esperanza de vida. Por otro lado, la sobrexpresión de *sgg* en el sistema nervioso provocaba cambios patológicos en las neuronas que producían un declive en la supervivencia y una reducción severa de la esperanza de vida, mientras que la sobreexpresión de *sgg* en músculos sólo provocó una reducción menor de la supervivencia.

Del mismo modo, los inhibidores de GSK3 han sido desarrollados y utilizados previamente para el tratamiento del cáncer. GSK3 regula a NK-  $\kappa$ B, que muchas veces está expresado de forma aberrante en trastornos inmunológicos así como en cáncer. En el caso del GB uno de los inhibidores de GSK3 que se desarrollaron previno el crecimiento de las células tumorales a través del aumento de la expresión de la caspasa-3 y caspasa-8, que inducen apoptosis en estas éstas (Duda et al., 2020). Otros estudios, como el de Kotliarova et al. (2008), encontraron a través de inhibidores de GSK3 y regulación genética a la baja de GSK3 $\alpha/\beta$  una reducción en la supervivencia celular y la clonogenicidad de las células tumorales de GB.

# 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: La inhibición de PDE7 y GSK3 en un modelo de GB de *Drosophila* tiene efectos en la regulación de la progresión del tumor.

Objetivos:

- Optimizar el protocolo del uso de compuestos inhibidores. En primer lugar es necesario realizar pruebas de concentraciones de compuestos para determinar las dosis eficaces y toxicidad.
- 2. Probar la eficacia de los compuestos en GB a través de la contabilización de células gliales y cuantificación del volumen del GB, y comparar estos resultados con los obtenidos en larvas control, con GB pero sin administración de los compuestos.
- Reevaluación de las concentraciones de los compuestos para la optimización de la administración. Después de la administración de diversas dosis de los fármacos es necesario reevaluar las concentraciones que sean más eficaces.

# 5. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1 Sistema de expresión UAS-GAL

Sistema binario utilizado para inducir la expresión de genes específicos de cualquier organismo en determinados tejidos con una temporalidad específica (Brand y Perrimon, 1993). Este sistema proviene de la levadura (*S. Cerevsiae*) y es análogo a otros sistemas equivalentes como podrían ser el LexA/LexOP (*E. Coli*) (del Valle Rodríguez et al., 2011), o el sistema QF/QUAS (*N. Crassa*) (Riabinina y Potter, 2016).

GAL4 es una proteína de la levadura que regula los genes inducidos por galactosa. GAL4 se puede poner bajo el control de cualquier promotor específico para generar la expresión del gen de interés bajo un patrón espacio-temporal determinado. Por el hecho de provenir de *S. Cerevsiae*, GAL4 no afecta a la transcripción de genes endógenos de *Drosophila*, ya que es específico para unirse a secuencias UAS y activar la transcripción de genes situados bajo el control de estas secuencias.

Este sistema se utiliza en *Drosophila* para activar la transcripción de genes exógenos bajo el control específico de un promotor unido a *GAL4*. Este promotor dirige la expresión del gen *GAL4*. La proteína GAL4 cuando se une a la diana UAS, activa la transcripción del gen de interés. Este gen de interés no se expresa en ausencia del factor de transcripción GAL4 (Brand y Perrimon, 1993).En este trabajo se utilizaron moscas macho con una construcción *RepoGal4, UAS-myr-RFP*/TM6B y hembras con *UAS-EGFR<sup>3</sup>, UAS-PI3K<sup>CAAX</sup>(Dp110)*, de forma que la coexpresión de las formas constitutivamente activas de EGFR y PI3K se dirigió específicamente a células de la glía (promotor Repo) para generar un GB (Figura 5).



Figura 5: Representación esquemática del funcionamiento del sistema UAS-GAL4.

Para que ésta expresión se produzca de forma controlada en el tiempo se puede utilizar un represor del sistema Gal4 denominado GAL80. En este trabajo utilizamos una forma termosensible (GAL80<sup>TS</sup>) que se encuentra activa a 17°C. Mientras GAL80<sup>TS</sup> está activo, inhibe la actividad de GAL4, por lo que éste no se une a UAS y no se produce la expresión del gen de interés (evitando la aparición del GB en este caso). Cuando aumentamos la temperatura a 29-30°C, GAL80<sup>TS</sup> se inactiva, lo que impide la inhibición de la función de GAL4, que activará la transcripción del gen de interés (Figura 6).





#### 5.2 Cruces genéticos

#### 5.2.1 Estirpes Drosophila

Para la realización de este trabajo se utilizaron dos líneas transgénicas de *Drosophila melanogaster*, ambas proporcionadas por el laboratorio C-12 del Instituto Cajal (CSIC – Centro Superior de Investigaciones Científicas). Las estirpes de *Drosophila* se conservaron en tubos con papilla en incubadores a 25°C con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Las estirpes utilizadas fueron las siguientes:

1) w: UAS-EGFR<sup>$$\lambda$$</sup>, UAS-PI3K<sup>CAAX</sup>(Dp110);  $\frac{cyo}{if}$ 

2) w: tubGal80<sup>TS</sup>/cyo;RepoGal4, UAS-myr-RFP/TM6B

La estirpe *w:UAS-EGFR<sup>i</sup>*, *UAS-PI3K<sup>CAAX</sup>(Dp110)* fue cedida por el laboratorio de Renee Read (Read et al., 2009). La estirpe (2) con la que se realiza el cruce proviene del Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC).

En este trabajo nos referiremos a la construcción (1) (*w*; *UAS-EGFR*<sup> $\lambda$ </sup>, *UAS-PI3K*<sup>*CAAX*</sup>(*Dp110*)) como "ON<sup>x</sup>" para simplificar la lectura ya que la construcción transgénica se encuentra insertada en el cromosoma X.

Para el cruce se utilizaron hembras vírgenes del stock ON<sup>x</sup> y machos (2) w;tubGal80<sup>TS</sup>/cyo;RepoGal4, UAS-myr-RFP/TM6B de tal modo que toda la descendencia del cruce hereda un cromosoma X y por tanto, desarrolla el GB.

Una vez seleccionados, se cruzaron 10 hembras vírgenes con 5 machos jóvenes en cada uno de los tubos. Estos tubos se mantuvieron 4 días a 25°C para que se produjera la copula y la puesta de huevos. Pasados estos 4 días se vaciaron los tubos y se dejaron otros 3 días a 29°C para permitir la activación del sistema Gal4/UAS y la expresión de los genes pro-tumorales. Finalmente, se procedió a seleccionar y diseccionar las larvas con GB.

### 5.2.1 Balanceadores

Los cromosomas balanceadores son una de las herramientas más utilizadas en *Drosophila*. Contienen inversiones múltiples para evitar recombinaciones meióticas con un cromosoma no reordenado. Estos genes portan mutaciones dominantes con un fenotipo fácilmente visible y mutaciones recesivas estériles o letales. Encontramos balanceadores para cada uno de los cromosomas principales. No hay necesidad de generar balanceadores para el cuarto cromosoma, ya que éste no se somete a recombinación meiótica. Las mutaciones más habituales que encontramos afectan a la forma y color del ojo adulto, la forma de las alas y la forma y número de los penachos (Stocker et al., 2008).

En este trabajo se utilizó un balanceador localizado en el tercer cromosoma: TM6B. Este balanceador es una inversión inducida por rayos X. TM6B lleva un marcador dominante y una mutación recesiva letal (Ashburner et al., 2005). Este balanceador se utilizó para poder distinguir aquellas larvas que desarrollaban un GB, por lo que se seleccionaron las que eran TM6B negativas.

#### 5.3 Compuestos

La administración de los fármacos en las larvas se realiza a través de la papilla de la que comen.

Los fármacos llegaron al laboratorio en forma sólida, por lo que se tuvo que realizar la dilución de los mismos. El medio que se utilizó para esta dilución es DMSO. Se realizaron las diluciones para que la concentración final del fármaco fuera de 200mM. Durante la realización de las diluciones se observó que ciertos fármacos no se podían disolver a una concentración tan alta,

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
VP3.15	100mM
VP1.14	100mM
VP1.15	200mM
S14	200mM
TC3.6	200mM
AGF2.20	200mM
TDZD8	200mM
Tideglusib	200mM
VP2.51	200mM
VP0.7	50mM

por lo que se tuvo que reducir la misma. Finalmente los fármacos y su concentración fueron los siguientes:

Tabla1: Listado de los compuestos utilizados con sus concentraciones.

VP3.15 y VP1.14se disolvieron a la concentración recomendada inicialmente (100mM), VP1.15, S14, TC3.6, AGF2.20, TDZD8, Tideglusib y VP2.51al doble de concentración (200mM) y VP0.7, debido a la dificultad encontrada para que se disolviera completamente, a la mitad de la concentración recomendada (50mM). Con el compuesto VP0.7, incluso realizando una dilución a 50mM, no se pudo disolver el soluto completamente en el medio. Aun así se decidió incorporarlo en los experimentos y analizar los resultados.

Los compuestos diluidos se mezclaron en la papilla (comida estándar) que se hace en el propio laboratorio. Una vez hecha la papilla, debido a que sigue conservando a 56°C, se mantiene en forma líquida, lo que permite la mezcla del compuesto con la comida. Esta papilla mezclada con el fármaco se pone en tubos donde finalmente se realizan los cruces y donde éstas moscas pondrán los huevos de los que saldrán las larvas que consumirán los compuestos.

Para las primeras pruebas se realizó una preparación de 5 mililitros de papilla con una cantidad de 5, 20 y 50 $\mu$ l de cada compuesto. Se comprobó que la concentración de 50 microlitros era tóxica para las larvas debido al DMSO, por lo que en la siguiente réplica se utilizaron concentraciones de 5, 20 y 35 microlitros. Debido a la poca cantidad de papilla utilizada, ésta se secaba, por lo que en el segundo ensayo se doblaron las cantidades de papilla y de fármaco, de modo que las cantidades eran de 10 mililitros de papilla y de 10, 40 y 70 $\mu$ l de compuesto.

Del mismo modo, en la primera réplica, durante el proceso de mezcla de fármacos con la papilla, se añadieron primero los compuestos a cada uno de los tubos en las concentraciones

correspondientes y después se llenaron con papilla. Realizar el proceso de este modo podía provocar que los compuestos se quedaran en el fondo de los tubos y no se mezclaran bien con la comida. En la segunda réplica se decidió realizar el proceso a la inversa, añadiendo primero la papilla y, mientras ésta seguía en estado líquido, se añadían los compuestos y se mezclaban para que se repartieran de forma más homogénea en toda la comida.

Para mantener la papilla en estado líquido se dejaba en un baño a 56°. Se sirvió en los tubos individualmente para evitar que se solidificara antes de tiempo.

A continuación se detallan cada uno de los compuestos:

VP3.15	VP1.14	VP1.15	<b>S14</b>	TC3.6
VP3.15 es una pequeña molécula	Se trata de un iminotiazol	Es un iminotiazol inhibidor dual	Este compuesto es una	Este compuesto es
que pertenece a la familia de los	inhibidor dual de GSK-3 y PDE7.	de GSK-3 y PDE7. La	quinazolina inhibidora	una quinazolina
iminotiazoles inhibidores duales	La modulacion de GSK-3 es	modulacion de GSK-3 es	de PDE7.	inhibidora de PDE7.
de GSK-3 y PDE7. La	alosterica (sustrato competitiva).	alosterica (sustrato competitiva).		
modulación de GSK-3 es				
alosterica (sustrato competitiva).				
Formula: C20H22N4OS	Formula: $C_{20}H_{16}N_4S$	Formula: C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> BrN <sub>3</sub> OS	Formula: C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OS	Formula: $C_{14}H_{10}N_2S_2$
IC50 GSK3 $\beta$ = 0,88 $\mu$ M	IC50 GSK3 $\beta$ = 1,28 $\mu$ M	IC50 GSK3 $\beta$ = 1,95 $\mu$ M	IC50 PDE7A = 4,68	IC50 PDE7A = $1,04$
IC50 PDE7A = 1,59 $\mu$ M	IC50 PDE7A = 0,38 μM	IC50 PDE7A = 1,11 μM	μΜ	μΜ
Estructura química:	Estructura química:	Estructura química:	Estructura química:	Estructura química:
	S-N N N 2HBr	HO N HBr	O N N S	S N N H S

AGF2.20	TDZD8	Tideglusib	VP2.51	VP0.7
Es un difenil sulfuro	Es una tiadiazolidindiona	Es una tiadiazolidindiona	Es un imino-tiadiazol inhibor	Es una quinolina modulador
inhibidor de PDE7.	inhibidora de GSK-3	inhibidora de GSK-3 ATP-	competitivo de GSK-3	alosterico de GSK-3
	ATP-no competitivo.	no competitivo.		
Formula: C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	Formula: $C_{10}H_{10}N_2O_2S$	Formula: $C_{19}H_{14}N_2O_2S$	Formula: $C_{12}H_8Me_3N_3O_3S$	Formula: $C_{21}H_{28}O_4N_3Et$
IC50 PDE7A = 0,37 μM	IC50 GSK3 $\beta = 2\mu M$	IC50 GSK3 $\beta$ = 60 nM	IC50 GSK3 $\beta$ = 0,62 $\mu$ M	IC50 GSK3 $\beta$ = 3,01 $\mu$ M
Estructura química:	Estructura química:	Estructura química:	Estructura química:	Estructura química:
NH <sub>2</sub> S CI NO <sub>2</sub>	O O S <sup>-N−</sup> CH <sub>3</sub>		Me MeO MeO	OH O NO Et

#### 5.4 Disección

Para la obtención de los cerebros de las larvas se realizó a las mismas una disección en guante. Se obtienen las larvas de los tubos y se comprueba el estadio en el que están. Las larvas utilizadas están en estadio III. Se puede distinguir por la forma de sus espiráculos. Como se puede observar en la figura 6, los espiráculos del estadio II son más pequeños y el final de los mismos es redondeado; mientras que en el estadio III son algo más grandes y el final tiene forma de "palmera".





Una vez obtenidas las larvas en estadio III, se comprobó bajo la lupa de fluorescencia que todas las que se seleccionaba tuvieran fluorescencia roja (indicativa de la presencia del GB, por el marcador RFP).

Después se realizó la disección en guante en PBS (*Phosphate-Buffered Saline*). Ésta consiste en sujetar con una pinza la parte más caudal de la larva (en el <sup>3</sup>/<sub>4</sub> de la longitud de la misma) y con otra pinza arrancar la parte que queda por debajo (Figura 8).



Figura 8: Imagen representativa del proceso de disección larvario.

Posteriormente, ubicando la punta de una de las pinzas en la mandíbula de la larva, con ayuda de las segundas pinzas, se le da la vuelta a la cutícula, de forma que el interior de la larva queda en la parte exterior y el exterior en la interior. Una vez dada la vuelta, se retiran los órganos de modo que sólo queda el cerebro y el ganglio dorsal pegados a la zona rostral (Figura 9).



Figura 9: Imagen representativa del proceso de disección larvario.

Cuando se realizaron disecciones de diversos compuestos a la vez las larvas se dejaron en FA (formaldehido) al 4% en hielo para prevenir modificaciones en el tiempo de fijación y evitar la degradación del tejido.

# 5.5 Inmunohistoquímica

Una vez diseccionados los cerebros de las larvas éstos se fijaban en FA (Formaldehido) al 4% en PBS durante 20 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados consecutivos con PBT (*Phosphate-Buffered Saline + tritón*) al 0.3% durante 10 minutos cada uno de ellos. Después se dejaron en bloqueo con BSA (albúmina de suero bovino) + PBT(0.3%) durante 1 hora. Una vez finalizado el bloqueo se incubaron los cerebros en anticuerpo primario overnight. Para marcar los núcleos de las células gliales y del GB, y contar el número de células gliales se utilizó el anticuerpo primario anti-Repo mouse de Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) (1:200).

Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBT durante 10 minutos cada uno y se aplicó el anticuerpo secundario: Alexafluor anti-mouse 488 de Invitrogen (1:500). Finalmente se realizaron 3 lavados más de 10 minutos en PBT y se pusieron las muestras en DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) durante una hora para marcar todas las células y facilitar la identificación posterior de las mismas antes de proceder a montarlas en los portaobjetos.

Finalmente se aisló el cerebro y se retiró el resto del tejido larvario, se colocaron los cerebros con la parte dorsal hacia arriba (Figura 10) y se cubrieron con un cubreobjetos para su observación en microscopía de fluorescencia y confocal.



*Figura 10*: Imagen representativa del montaje de las muestras de cerebros.

## 5.6 Toma de imágenes

Para la toma de imágenes de imágenes se utilizó un microscopio confocal Lecia SP5 (Leica Microsystems). Para los cerebros se utilizó un objetivo de 20x, con planos en el eje Z de

	Excitación	Pico de emisión
DAPI (azul)	405nm	415-473nm
488 (verde)	488nm	498-546nm
RFP (rojo)	561nm	532-550nm

1024x512 píxeles y 1,5µm de separación. Valores de excitación y picos de emisión de cada longitud de onda:

*Tabla2*: valores de excitación y pico de emisión de los diferentes canales utilizados en el microscopio confocal.

En función de la disponibilidad del servicio de microscopía confocal del Instituto Cajal se utilizó un microscopio directo o invertido, con la diferencia de que el objetivo de 20x del primero se utiliza en seco, mientras que el del segundo es de inmersión en aceite. Se utilizaron las mismas condiciones con todos los cerebros.

## 5.7 Análisis de imágenes

Para el análisis de las imágenes tomadas en microscopía confocal se utilizó el programa Imaris en su versión 6.3.1.

En primer lugar, para los contajes celulares realizados se utilizó la herramienta "*Spots*". Se selecciona el área que se quiere analizar, pidiéndole en primer lugar que analice sólo una región de interés; en este caso el recuento de células se hizo por separado en cada lóbulo. Una vez seleccionada la zona, escoges el canal que quieres que detecte y el diámetro estimado (en este caso 5µm). Para el filtro se utilizó "*Intensity sum*" y se ajustó manualmente la selección de células, ya que de forma automática, en muchas ocasiones, pasaba por alto algunas de éstas células. Una vez finalizado, con la herramienta "*edit*", de ser necesario, se eliminan algunas selecciones de células que quedan fuera del lóbulo. Finalmente, en el apartado "*statistics*" aparece el número de células contabilizado.

En cuanto a los contajes del volumen de la membrana, con el mismo programa, se utilizó la herramienta "*Surfaces*". Del mismo modo que en el contaje de células, se selecciona el área de interés (en este caso, uno de los lóbulos) y posteriormente escogemos el canal que nos interesa analizar. Una vez aparece el área que identifica, se ajusta manualmente la superficie detectada. Seleccionamos como filtro "*intensity* sum". Finalmente, en el apartado de "*statistics*" accedemos a "*detailed*" y seleccionamos "*Average values*". El valor que buscamos es el que se encuentra en la fila "*volume*" y la columna "*sum*".

En relación al análisis de algunas de las imágenes tomadas, en determinados casos ha sido necesario descartar alguna de ellas debido a que, bien la toma o el proceso de inmunohistoquímica no han sido del todo adecuados, observándose una falta completa de marcaje celular en determinadas zonas.

## 5.8 Análisis estadísticos

Los resultados de los análisis de cuantificación a través del contaje de células gliales y volumen de la membrana glial se trataron con Excel (Excel Office) y posteriormente el análisis estadístico se realizó con GraphPad 5. Se realizaron análisis de ANOVA con un post-test de Bonferroni. El p valor para rechazar la hipótesis nula y afirmar diferencias estadísticas significativas entre los datos fue de p<0.05.

#### 6. **RESULTADOS**

#### 6.1 Calibrado de los compuestos

Las primeras administraciones de los fármacos que se realizaron a las larvas de *Drosophila melanogaster* fueron en concentraciones de 5, 20 y 50µl del compuesto en DMSO (con las concentraciones correspondientes mencionadas anteriormente – apartado 5.3) por cada 5 ml de papilla. Se observó que en aquellos tubos en los que se añadía 50µl del compuesto los embriones no alcanzaban estadios larvarios. Por lo tanto, se concluyó que las cantidades de DMSO eran tóxicas para las larvas.

Se decidió realizar una réplica del experimento modificando las cantidades utilizadas. En este caso las concentraciones fueron de 5,  $20 \text{ y} 35 \mu \text{l}$ .

# 6.2 Efecto de los inhibidores de GSK3 y PDE en cerebros con GB: contaje celular y volumétrico

Evaluamos el efecto de los fármacos en el crecimiento de los cerebros de larva con GB. Lo hacemos a través del contaje de células de glía y la medición volumétrica de la membrana glial. Para ello utilizamos una estirpe de *Drosophila* en la que se coexpresa las formas constitutivamente activas de PI3K y EGFR utilizando el sistema de expresión UAS-Gal4 (ver materiales y métodos – 5.1 y 5.2). Realizamos un marcaje de los núcleos de las células gliales (anti-repo) con inmunohistoquímica, se procedió a montar las muestras y se tomaron las imágenes con microscopía confocal. Una vez tomadas, se cuantificaron las células y el volumen de la membrana glial (gracias a la construcción genética *RFP-myr*, que marca la membrana con un marcador fluorescente rojo). Finalmente se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos.

Las muestras de AGF2.20 (5µl) se perdieron debido a problemas con el montaje de las mismas. Por otro lado, en las muestras de AGF2.20 (20µl) y TDZD8 (5µl) las larvas no llegaron a desarrollarse hasta el estadio III, lo que sugiere que pueden ser tóxicas.

Comparamos el número de células gliales contabilizadas en cerebros con GB que ingieren el vehículo DMSO (control vehículo), y los comparamos con las cuantificaciones de cerebros de animales que han ingerido cada uno de los compuestos.



*Gráfica 1*: Representación de los datos obtenidos del análisis y cuantificación de las células gliales en cada una de las condiciones de la primera mitad de compuestos (control – azul, control vehículo (con DMSO) – morado (5µl) y verde (20µl) y experimental (con los compuestos). Marcado con un asterisco las condiciones que muestran diferencias en comparación con el control positivo. Para p < 0.05 (\*); para p < 0.01 (\*\*); para p < 0.001 (\*\*\*) ANOVA.

# Contaje células gliales



*Gráfica 2*: Representación de los datos obtenidos del análisis y cuantificación de las células gliales en cada una de las condiciones de la segunda mitad de compuestos (control – azul, control vehículo (con DMSO) – morado (5µl) y verde (20µl) y experimental (con los compuestos). Marcado con un asterisco las condiciones que muestran diferencias en comparación con el control positivo. Para p < 0.05 (\*); para p < 0.01 (\*\*); para p < 0.001 (\*\*\*) ANOVA.

Se presentan dos C. Vehículo (5 y  $20\mu$ l) por cada concentración ya que se realizaron las pruebas de los compuestos en dos experimentos independientes, debido a la cantidad elevada de fármacos y concentraciones. De este modo, los dos C. Vehículo que aparecen primeros pertenecen a la primera mitad de compuestos probados; y los segundos a la segunda mitad.

Podemos observar que hay diversos compuestos, así como dos de los controles vehículos, que muestran diferencias significativas con el control positivo (azul). Del mismo modo, ninguno de los compuestos es significativamente diferente a los controles vehículo correspondientes a su concentración. Aun así, algunos de los tratamientos muestran tendencias de disminución del número de células gliales.

Por otro lado, se realizaron las medidas volumétricas de la membrana glial y comparamos los datos obtenidos de los controles y los tratados.



Contaje volumen membrana glial

*Gráfica 3*: Representación de los datos obtenidos del análisis y cuantificación del volumen de la membrana glial en cada una de las condiciones de la primera mitad de compuestos (control – azul, control vehículo (con DMSO) – morado (5µl) y verde (20µl) y experimental (con los compuestos). Marcado con un asterisco las condiciones que muestran diferencias en comparación con el control positivo. Para p < 0.05 (\*); para p < 0.01 (\*\*); para p < 0.001 (\*\*\*) ANOVA.

#### Contaje volumen membrana glial



*Gráfica 4*: Representación de los datos obtenidos del análisis y cuantificación del volumen de la membrana glial en cada una de las condiciones de la segunda mitad de compuestos (control – azul, control vehículo (con DMSO) – morado (5µl) y verde (20µl) y experimental (con los compuestos). Marcado con un asterisco las condiciones que muestran diferencias en comparación con el control positivo. Para p < 0.05 (\*); para p < 0.01 (\*\*); para p < 0.001 (\*\*\*) ANOVA.

Se presentan dos C. Vehículo (5 y  $20\mu$ l) por cada concentración ya que se realizaron las pruebas de los compuestos en dos experimentos debido a la cantidad elevada de fármacos y concentraciones. De este modo, los dos C. Vehículo que aparecen primeros pertenecen a la primera mitad de compuestos probados; y los segundos a la segunda mitad.

Podemos observar en la distribución de los datos de las gráficas que las muestras de los compuestos TC3.6 (5µl), TDZD8 (5µl) y VP0.7 (5µl) muestran una tendencia de reducción del volumen de superficie de la membrana glial, si bien es cierto que ninguno de ellos muestra diferencias significativas con los controles vehículo.

Tanto para las cuantificaciones de las células de la glía como para el volumen de la membrana glial sería necesario realizar una réplica y estudiar de forma más detallada los efectos del DMSO y de los compuestos por separado.

#### 6.2.1 Inhibidores duales de PDE7 y GSK3

De entre los fármacos del grupo de inhibidores duales de PDE7 y GSK3 VP3.15 es el compuesto que muestra diferencias significativas en el descenso de número de células gliales en comparación con un cerebro con GB no tratado. A continuación mostramos imágenes representativas de la condición control y el compuesto VP3.15:



#### Figura 11: Efectos en el desarrollo del GB tras la aplicación del fármaco VP3.15 (5 y 20µl).

Imágenes comparativas de un cerebro control con un GB desarrollado (A-D) y otro con un GB y tratamiento con VP3.15 (E-H). En verde encontramos las células gliales (Repo), en rojo la membrana de la glía o red glial (RFP) y en azul los núcleos celulares marcados con DAPI.

En la comparación de la figura 11 podemos apreciar una reducción del volumen del tumor en la muestra tratada con el compuesto VP3.15 (imágenes E-H). Las imágenes B y F muestran una reducción del número de células gliales a través del marcaje con anti-repo (verde). Las imágenes C y G muestran una reducción en el volumen de la red glial (rojo).

#### Inhibidor dual PDE7 y GSK3



*Gráfica 5*: Cuantificación de células gliales en cerebros con y sin tratamiento. En azul el control positivo (GB sin compuesto ni DMSO), en morado el control vehículo (GB con DMSO - 5 $\mu$ l) y en rojo el compuesto VP3.15 (5 $\mu$ l). Para p<0.05 (\*); para p<0.01 (\*\*); para p<0.001 (\*\*\*) ANOVA.

Como podemos observar en la Gráfica 5, el compuesto VP3.15 muestra diferencias significativas en comparación con el control y el control vehículo (p<0.05 test ANOVA). Por otro lado vemos que no hay diferencias significativas entre el control positivo y control vehículo.

#### 6.2.2 Inhibidores de PDE7

De entre todos los fármacos inhibidores de PDE7 que utilizamos los que parecen tener una tendencia a reducir el número de células gliales son TC3.6 y S14. Por otro lado, TC3.6 parece tener un cierto potencial en la reducción del tamaño de la membrana glial. A continuación mostramos imágenes representativas de la condición control y los compuestos TC3.6 y S14:



*Figura 12*: Efectos en el desarrollo del GB tras la aplicación del fármaco TC3.6 (20μl) y S14 (20μl). Imágenes comparativas de microscopía confocal de un cerebro control con un GB desarrollado (A-D) y otros con un GB y tratamiento con dos compuestos: TC3.6 (E-H) y S14 (I-L). En verde encontramos las células gliales (Repo), en rojo la membrana de la glía o red glial (RFP) y en azul los núcleos celulares marcados con DAPI.

En la figura 11 podemos observar la comparación de un cerebro GB control con dos compuestos inhibidores de PDE. En este caso no se aprecia una reducción del tamaño del tumor (imágenes A-D, E-H y I-L), aunque el marcaje de las células de la glía es menor en los cerebros con compuestos (imágenes F y J).

#### 6.2.3 Inhibidores de GSK3

Del resto de fármacos que inhibien a GSK3 los que parece que pueden tener algun papel en la reducción de las células gliales son TDZD8 y VP0.7. Ambos, juntamente con VP2.51, parece que puedan tener alguna relación con la reducción del volumen de la membrana glial. A continuación mostramos imágenes representativas de la condición control y los compuestos TDZD8 y VP0.7:



*Figura 13*: Efectos en el desarrollo del GB tras la aplicación del fármaco TDZD8 (5μl) Y VP0.7 (5μl). Imágenes comparativas de microscopía confocal de un cerebro control con un GB desarrollado (A-D) y otros con un GB y tratamiento con dos compuestos: TDZD8 (E-H) y VP0.7 (I-L). En verde encontramos las células gliales (Repo), en rojo la membrana de la glía o red glial (RFP) y en azul los núcleos celulares marcados con DAPI.

Los cerebros que observamos en la figura 13 muestran diferencias en cuanto al tamaño entre los GB tratados (imágenes E-H y I-L) y los controles (imágenes A-D). En el compuesto TDZD8 (imagen F) hay un menor marcaje celular de la glía que en el control (imagen B), aunque no muestra diferencias significativas.

## 6.3 Reevaluación de las concentraciones de los compuestos

En la segunda réplica del experimento se utilizaron concentraciones de 5, 20 y 35µl de los compuestos. Se observó que las últimas seguían siendo demasiado altas produciéndose retrasos considerables en el crecimiento de las larvas y final no llegaban a término. Se estableció 20µl como el umbral máximo de concentración que se podía administrar en la papilla sin llegar a ser letal.

Las pruebas finales de los fármacos que parecía que tenían tendencias positivas en la inhibición del desarrollo del tumor se hicieron entonces exclusivamente en las concentraciones de 5 y  $20\mu$ l (en función de los resultados).

# 7. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha analizado en un modelo de *Drosophila* el efecto de compuestos inhibidores de las vías de PDE y GSK3 relacionadas con el desarrollo del GB. Los resultados sugieren que hay una tendencia a la reducción del crecimiento del GB, tanto del número de células tumorales como en el volumen del tumor, tras el tratamiento con algunos de los compuestos.

El GB es el tumor cerebral primario más agresivo del sistema nervioso y presenta recidivas de forma casi inevitable en todos los pacientes que lo sufren a pesar de los tratamientos actuales (Campos et al., 2016). Dentro de la rama de la oncología es uno de los tumores malignos más difíciles de tratar y aunque se ha avanzado mucho en su conocimiento, los tratamientos actuales no ofrecen buenos resultados (Alexander et al., 2017).

Actualmente, a los pacientes con GB, se les realiza una resección quirúrgica del tumor, seguida de radioterapia y tratamiento de quimioterapia con Temozolomida (TMZ) y un adyuvante de TMZ. Se realizaron estudios para comprobar si era necesario realizar terapias diferentes en función de la edad de los pacientes que desarrollan el GB. Se observó que la radioterapia en conjunto con el tratamiento de TMZ incrementaba la esperanza de vida independientemente de la edad del paciente. Para los tumores recurrentes se utiliza Bevacizumab como fármaco de elección (Alexander et al., 2017).

Se han realizado estudios muy diversos probando terapias para tratar el GB. Algunos de ellos se basan en modificaciones en células madre para estimular la liberación de proteínas antriproliferativas y proapoptóticas, enzimas de conversión a drogas tóxicas, antiangiogénicos, factores pro y anti-inflamatorios, etc. (Abadi et al., 2021). Otras investigaciones han estudiado la posibilidad de aplicar terapia lumínica a través de agentes fotosensibilizadores dirigidos a las células tumorales (Vasilev et al., 2020). También ha sido extenso el estudio del desarrollo de inmunoterapias para el GB, aunque los resultados obtenidos han sido poco prometedores (Medikonda et al., 2021).

Otro enfoque de investigación relevante en la actualidad es el estudio de compuestos que interfieran con la actividad aberrante de determinadas moléculas que se encuentran alteradas en el GB. Se ha focalizado este estudio en la detención de la angiogénesis, modificaciones en el metabolismo aberrante, desregulaciones epigenéticas, funcionamiento inmune aberrante, etc. (Zhou et al., 2020). Como ya se ha comentado en la introducción, son muchas las alteraciones genéticas y moleculares que encontramos en pacientes con GB. Las más destacables son aquellas relacionadas con *IDH*, *TP53*, *MGMT*, *P13K* y *EGFR*.

En relación a estas vías mencionadas, PDE y GSK3 son dos componentes que forman parte de las mismas y se relacionan con el desarrollo tumoral del GB. La sobreexpresión de *PDE* (*PDE7*) implica un aumento en el desarrollo del tumor ya que comporta una reducción de los niveles de AMPc, que interviene en la inhibición del crecimiento celular. La vía de PI3K participa en el control del metabolismo de glucosa y éste metabolismo se encuentra alterado en las células tumorales (Hoxhaj y Manning, 2020). Del mismo modo el AMPc es un componente en la regulación del metabolismo celular (Ravnskjaer et al., 2015). Es posible que la alteración de la vía de PI3K afecte al metabolismo, alterando de este modo el funcionamiento del AMPc. Es necesario indagar más en la investigación de este supuesto para poder afianzarlo.

Por otro lado, los niveles de GSK3 $\beta$  se encuentran aumentados en pacientes con GB. La fosforilación de esta proteína produce efectos pro-tumorales a través de la modulación de  $\beta$ -catenina, NF- $\kappa$ B y c-MYC, relacionados principalmente con proliferación y supervivencia celular. La modulación de GSK3 $\beta$  viene dada por la vía de PI3K, a través de la proteína quinasa Akt.

Estas características convierten a PDE7 y GSK3 en posibles dianas para el tratamiento de GBs. Estudios previos realizados sobre estas mismas dianas muestran resultados prometedores en modelos de cultivo y xenograft, aunque presentan dificultades en su efectividad en los ensayos clínicos.

Estudios sobre compuestos <u>inhibidores de PDE</u> encontraron aumentos en los niveles de AMPc y estos niveles correlacionaban positivamente con una inhibición del crecimiento celular in vitro (Safitri et al., 2020). De un modo parecido, en este trabajo se ha observado una clara tendencia a la reducción del número de células gliales, así como del volumen de la membrana glial tras la aplicación del compuesto TC3.6 (inhibidor de PDE) *in vivo*. Si bien es cierto que no se encontraron diferencias significativas, sería interesante repetir el procedimiento con una *n* mayor.

Los compuestos utilizados en este trabajo que eran inhibidores exclusivamente de PDE, TC3.6 y S14, se han probado en modelos murinos y cultivos celulares de otras enfermedades como esclerosis múltiple, encefalitis autoinmune, diferenciación y supervivencia de precursores de oligodendrocitos, lesiones médula espinal y alzhéimer pero no en GB.

En cuanto a los <u>compuestos que inhiben la acción de GSK3</u> $\beta$ , se han probado diferentes fármacos que inhiben la fosforilación y activación de Akt (un efector de la vía de GSK3 $\beta$ ), observando resultados prometedores en la inhibición del desarrollo del GB en cultivos celulares pero con pobres resultados en modelos de xenograft (Atkins et al., 2021; Henke et al. 2012; Qin et al., 2013).

En otros artículos se ha hecho uso del compuesto <u>Tideglusib</u> para comprobar si tenía efectos sobre el crecimiento del tumor. Zhou et al. (2016) encontraron reducciones en el tamaño del tumor in vitro. En modelos de xenograft en ratón con GB encontraron también una disminución significativa del volumen del tumor en comparación con los controles (Zhou et al, 2016). En contraste, en este trabajo los valores obtenidos en el contaje celular y volumétrico en este compuesto no muestran diferencias significativas ni tendencias a la disminución en comparación con los controles vehículo.

En la misma línea que los resultados de este trabajo, donde TDZD8 muestra tendencias a la reducción del número de células de glía y volumen de la matriz glial, otros estudios encontraron reducciones en la proliferación y aumentos en la apoptosis en células in vitro, así como un retraso en el crecimiento in vivo y un aumento de la supervivencia del animal (Aguilar et al., 2010).

Otros compuestos inhibidores de GSK3 probados en este trabajo (VP2.51 y VP0.7) han sido utilizados en otras enfermedades como depresión, enfermedad de la motoneurona o encefalitis autoinmune pero no han sido probados para el tratamiento del GB.

En cuanto a los <u>compuestos de inhibición dual de PDE y GSK3</u> (VP3.15, VP1.14, VP1.15 y AGF2.20) se han probado en otras enfermedades como, esclerosis múltiple, encefalitis autoinmune, enfermedades de la retina, daño hipocampal, psicosis, lesión medular, diferenciación, etc.

De forma general, de entre todos los compuestos utilizados en este trabajo, los que tienen un mayor efecto en la reducción del número de células gliales y de volumen de la red glial son los inhibidores de GSK3. Aunque el compuesto inhibidor de PDE TC3.6 que muestra una cierta eficacia, ésta parece ser menor que la observada en los compuestos inhibidores de GSK3 a concentraciones equivalentes.

Por último, investigaciones recientes remarcan las diferencias en las mutaciones genéticas, perfil de expresión genética, microambiente, etc. entre las células que conforman el núcleo del tumor y las que están en la periferia. La recurrencia de estos tumores se desarrolla a partir de células tumorales que se encuentran en esta periferia (Campos et al., 2016). Sería interesante abordar terapias que además de atacar al tumor primario se puedan focalizar también en tratar al tumor que reaparece.

#### 7.1 Limitaciones

Durante el desarrollo de los experimentos presentados se encontraron una serie de limitaciones y problemáticas que presentaremos a continuación. En primer lugar, para este trabajo se

realizaron dos réplicas, cuyos resultados resultaron ser algo dispares. En la primera réplica los valores de los contajes del número de células gliales, así como del volumen de la membrana glial, no mostraban ninguna tendencia de cambio en comparación con los controles. Estas diferencias probablemente se dieron debido a la metodología utilizada para la administración del compuesto en la papilla. Inicialmente se añadió el fármaco en primer lugar y después la papilla paralelamente en todos los tubos. Probablemente, sobre todo en las concentraciones menores, el fármaco se secó parcialmente en el fondo del tubo mientras no se añadía la papilla. En la segunda réplica se añadió primero la papilla y posteriormente el fármaco; además se realizó cada mezcla secuencialmente en cada compuesto y concentración.

En segundo lugar, en ciertos grupos control se encontraron larvas que desarrollaron gliomas con un menor número de células y un volumen más reducido que algunos cerebros con GB y tratamiento. Por ese motivo, para poder validar los experimentos, se utiliza un número elevado de controles a lo largo del trabajo.

Otra de las limitaciones son las *n* de los grupos. Debido a la temporalidad concreta que se aplica en la metodología para el desarrollo de las larvas, y los posibles efectos de algunos compuestos sobre la velocidad del desarrollo embrionario, encontramos grupos experimentales en los que las larvas ya habían pupado, mientras que en otros todavía no habían alcanzado el estadio III. Para solucionar este problema, propongo usar ventanas temporales más amplias y hacer un seguimiento individualizado de cada muestra experimental. Además, en algunos compuestos (TDZD8 y AGF2.20 en la cantidad de  $20\mu$ l) no llegaron a desarrollarse larvas de estadio III. Sabemos que en aquellas pruebas realizadas con cantidades de DMSO mayores a  $20\mu$ l parecía producirse un retraso en el desarrollo de las larvas, pero desconocemos si en el caso de estos compuestos este retraso se producía por el fármaco en sí.

Del mismo modo, una de las muestras obtenidas de un compuesto se perdió en el proceso de obtención de imágenes de la misma. Actualmente se está realizando una réplica de este compuesto (AGF2.20), así como de algunos de los otros que muestran tendencias a la reducción del GB.

Finalmente, es necesario remarcar las diferencias que encontramos en los contajes realizados en las larvas control de los dos grupos de fármacos. Los análisis se realizaron en dos grupos con la mitad de fármacos en cada uno para facilitar el trabajo debido a la gran cantidad de muestras y condiciones de cada uno de ellos. Durante el análisis se observó que el contaje celular en los cerebros de larvas control era diferente entre los dos grupos. Estos resultados son relativos a los controles por lo que, en cada grupo experimental se incluyeron los controles correspondientes. Hay factores como la humedad relativa, pequeños cambios en la temperatura, pequeños cambios en la alimentación y posiblemente, factores desconocidos, que puede afectar a los resultados

obtenidos. Por este motivo, es especialmente importante incluir los correspondientes controles en cada experimento. En este caso se podría realizar un ensayo con todos los compuestos y un solo grupo control con una n grande para evitar disparidades entre los grupos control de los diferentes fármacos.

#### 7.2 Perspectivas futuras

Como posible continuación a este trabajo se propone una profundización en el estudio de los compuestos y realizar ensayos de los mismos en diferentes modelos.

Para empezar, sería interesante probar modificaciones de estos compuestos en su estructura química, ya se al azar o de forma dirigida. De este modo se valora de nuevo su eficacia para el tratamiento del GB.

Otro de los puntos importantes a desarrollar en el futuro es comprobar si el efecto que producen estos compuestos es a través de la inhibición de las dianas propuestas (PDE y GSK3). En el caso de las PDE, una opción para comprobar la inhibición de PDE sería analizar los balances de AMPc en cerebros con GB y cerebros con GB y tratamiento. Esto se podría realizar con un kit de análisis de AMPc (cAMP, Biotrak<sup>TM</sup> EIA System). Para evaluar la inhibición de GSK3, se podrían comprobar los niveles de GSK3 $\beta$  fosforilados y no fosforilados con anticuerpos específicos. También existe la opción de utilizar anticuerpos para determinadas dianas de GSK3 $\beta$  como G $\alpha$ s (subunidad alfa de G<sub>s</sub>), NF- $\kappa$ B o c-MYC. Finalmente, se podría comprobar a través del uso de RNAi específico de cada uno de los genes de interés para validar si el silenciamiento de dichos genes frena el desarrollo del tumor.

También es importante probar la supervivencia en adultos de *Drosophila*. En este trabajo se realizaron algunos ensayos parciales para comprobar la supervivencia en adultos de *Drosophila* y comprobar si la reducción en el número de células gliales o el volumen de la red glial correlaciona con la supervivencia. Las primeras instancias de estos experimentos muestran una mayor supervivencia en aquellos compuestos que se relacionan con la inhibición de PDEs (VP3.15, VP1.14, VP1.15, TC3.6), aunque destacó también un compuesto inhibidor de GSK3 (VP2.51). Curiosamente, algunos de los compuestos en los que se observaba supervivencia eran aquellos en los que no había cambios significativos a nivel celular o de red glial. Esto propone la posibilidad de que haya diversos factores más allá del número de células o el tamaño del tumor que intervengan en la supervivencia del paciente. En esa misma línea, en nuestro laboratorió se publicó un artículo en el que se indagaba en la importancia de la comunicación entre las células tumorales del GB y las neuronas. Observaron que las células del GB "vampirizaban" (deplecionan) WNT de las neuronas, produciendo neurodegeneración (Portela et al., 2019).

Una vez comprobado si se producen efectos de inhibición en el desarrollo del tumor, se deberían realizar estudios que nos sirvan para determinar si estos compuestos tendrían la misma efectividad en células humanas. El siguiente paso sería probar estos compuestos en cultivos celulares humanos de GB. Algunos de los compuestos probados ya se han testado in vitro, pero muchos de los que aparecen en este trabajo se han utilizado únicamente para probar sus efectos en enfermedades distintas al GB.

Finalmente, si los compuestos muestran eficacia en cultivos celulares, sería necesario estudiar estas mismas células de GB humano en un modelo que permita la interacción de estas células con el entorno. El modelo que nos permite observar el desarrollo de células de GB en animales es el xenograft. En este laboratorio se realizaron ya pruebas con este modelo para determinar el papel del gen *kish* y del compuesto Brefeldina-A en la modulación del reciclaje vesicular de EGFR (Portela et al., 2018).

Siendo éste el objetivo final, en caso de que alguno de los compuestos muestre resultados significativos a lo largo de todo el proceso, se procedería a realizar un ensayo clínico del fármaco. Es de especial importancia remarcar que el funcionamiento de los compuestos no se dará de la misma manera en todos los GB. Las diferentes mutaciones producidas en los genes afectados determinan el nivel de efectividad de estos fármacos en cada uno de los pacientes. Aquellos que tienen un mejor pronóstico son los que tienen mutaciones en *IDH*. Por otro lado, investigaciones previas realizadas en el laboratorio (Portela et al., 2018), mostraron que el efecto del compuesto Brefeldina-A en la regulación del tráfico vesicular y prevención del crecimiento del GB se restringía a GB "p53-wild-type" y no en modelos de GB con p53 mutado.

# 8. CONCLUSIONES

- *Drosophila* es un modelo con un gran potencial para el estudio de procesos biológicos.
- El modelo de *Drosophila* es adecuado para el estudio del desarrollo de enfermedades en humanos, así como la búsqueda sistemática de compuestos para su tratamiento.
- PDE y GSK3 son potenciales dianas terapéuticas contra el GB a través de su inhibición.
- Los inhibidores de PDE muestran una eficacia modesta en la inhibición del desarrollo de GB.
- Los inhibidores de GSK3 muestran una eficacia razonable en la inhibición del desarrollo de GB.
- Los inhibidores duales de GSK3 y PDE muestran una eficacia mayor en la inhibición del desarrollo de GB.
- Los compuestos VP3.15, TC3.6, TDZD8 VP2.51 y VP0.7 son de especial interés y muestran un mayor potencial terapéutico en GB.

#### 9. **REFERENCIAS**

- Abadi, B., Ahmadi-Zeidabadi, M., Dini, L., & Vergallo, C. (2021). Stem cell-based therapy treating glioblastoma multiforme. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 14(1), 1–15. https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2020.08.001
- Abdul, A. U. R. M., De Silva, B., & Gary, R. K. (2017). The GSK3 kinase inhibitor lithium produces unexpected hyperphosphorylation of β-catenin, a GSK3 substrate, in human glioblastoma cells. *Biology Open*. Published. <u>https://doi.org/10.1242/bio.030874</u>
- Aguilar-Morante, D., Morales-Garcia, J. A., Sanz-SanCristobal, M., Garcia-Cabezas, M. A., Santos, A., & Perez-Castillo, A. (2010). Inhibition of Glioblastoma Growth by the Thiadiazolidinone Compound TDZD-8. *PLoS ONE*, 5(11), e13879. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013879</u>
- Alexander, B. M., & Cloughesy, T. F. (2017). Adult Glioblastoma. Journal of Clinical Oncology, 35(21), 2402–2409. <u>https://doi.org/10.1200/jco.2017.73.0119</u>
- Ashburner, M., Hawley, R., & Golic, K. (2005). *Drosophila* (2nd ed., pp. 537-538). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Atkins, R. J., Dimou, J., Paradiso, L., Morokoff, A. P., Kaye, A. H., Drummond, K. J., & Hovens, C. M. (2012). Regulation of glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3β) by the Akt pathway in gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience*, 19(11), 1558–1563. <u>https://doi.org/10.1016/j.jocn.2012.07.002</u>
- Beurel, E., Grieco, S. F., & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 148, 114–131. <u>https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016</u>
- Brand, A., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401–415. <u>https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401</u>
- Brandes, A. A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., & Vecht, C. (2008). Glioblastoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 67(2), 139–152. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.02.005
- Brooks, M. D., Jackson, E., Warrington, N. M., Luo, J., Forys, J. T., Taylor, S., ... Rubin, J. B. (2014). PDE7B Is a Novel, Prognostically Significant Mediator of Glioblastoma

Growth Whose Expression Is Regulated by Endothelial Cells. *PLoS ONE*, 9(9), e107397. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107397

- Campos, B., Olsen, L. R., Urup, T., & Poulsen, H. S. (2016). A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene*, 35(45), 5819–5825. https://doi.org/10.1038/onc.2016.85
- Cesarini, V., Martini, M., Vitiani, L. R., Gravina, G. L., Di Agostino, S., Graziani, G., ... Dolci, S. (2017). Type 5 phosphodiesterase regulates glioblastoma multiforme aggressiveness and clinical outcome. *Oncotarget*, 8(8), 13223–13239. <u>https://doi.org/10.18632/oncotarget.14656</u>
- Chaurasia, A., Park, S. H., Seo, J. W., & Park, C. K. (2016). Immunohistochemical Analysis of ATRX, IDH1 and p53 in Glioblastoma and Their Correlations with Patient Survival. *Journal of Korean Medical Science*, 31(8), 1208. https://doi.org/10.3346/jkms.2016.31.8.1208
- Chen, A. S., & Read, R. D. (2019). Drosophila melanogaster as a Model System for Human Glioblastomas. Advances in Experimental Medicine and Biology, 207–224. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-030-23629-8\_12</u>
- Davis, M. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 20(5), S2-S8. <u>https://doi.org/10.1188/16.cjon.s1.2-8</u>
- Day, J., Dow, J., Houslay, M., & Davies, S. A. (2005). Cyclic nucleotide phosphodiesterases in Drosophila melanogaster. Biochemical Journal, 388(1), 333–342. <u>https://doi.org/10.1042/bj20050057</u>
- del Valle Rodríguez, A., Didiano, D., & Desplan, C. (2011). Power tools for gene expression and clonal analysis in Drosophila. *Nature Methods*, 9(1), 47–55. <u>https://doi.org/10.1038/nmeth.1800</u>
- Drosophila life cycle and fly anatomy | Cherry Biotech. (2018, 11 julio). Recuperado 15 de junio de 2021, de <u>https://www.cherrybiotech.com/scientific-note/drosophila-life-cycle-and-fly-anatomy</u>
- Duda, P., Akula, S. M., Abrams, S. L., Steelman, L. S., Martelli, A. M., Cocco, L., ... McCubrey, J. A. (2020). Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer. Cells, 9(5), 1110. <u>https://doi.org/10.3390/cells9051110</u>

- FlyBase Gene Report: Dmel\Pde1c. (2021, 17 agosto). Recuperado 6 de septiembre de 2021, de http://flybase.org/reports/FBgn0264815
- FlyBase Gene Report: Dmel\Pde6. (2021, 17 agosto). Recuperado 6 de septiembre de 2021, de http://flybase.org/reports/FBgn0038237
- FlyBase Gene Report: Dmel\Pde8. (2021, 17 agosto). Recuperado 6 de septiembre de 2021, de http://flybase.org/reports/FBgn0266377
- FlyBase Gene Report: Dmel\Pde9. (2021, 17 agosto). Recuperado 6 de septiembre de 2021, de <a href="http://flybase.org/reports/FBgn0259171">http://flybase.org/reports/FBgn0259171</a>
- FlyBase Gene Report: Dmel\Pde11. (2021, 17 agosto). Recuperado 6 de septiembre de 2021, de http://flybase.org/reports/FBgn0085370
- FlyBase Gene Report: Dmel\sgg. (2021, 17 agosto). Recuperado 1 de septiembre de 2021, de http://flybase.org/reports/FBgn0003371
- Furnari, F. B., Fenton, T., Bachoo, R. M., Mukasa, A., Stommel, J. M., Stegh, A., ... Cavenee, W. K. (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & Development*, 21(21), 2683–2710. <u>https://doi.org/10.1101/gad.1596707</u>
- Henke, G., Meier, V., Lindner, L. H., Eibl, H., Bamberg, M., Belka, C., ... Jendrossek, V. (2012). Effects of ionizing radiation in combination with Erufosine on T98G glioblastoma xenograft tumours: a study in NMRI nu/nu mice. *Radiation Oncology*, 7(1), 172. <u>https://doi.org/10.1186/1748-717x-7-172</u>
- Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2019). The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 20(2), 74–88. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7
- Korona, D., Nightingale, D., Fabre, B., Nelson, M., Fischer, B., Johnson, G., ... Russell, S. (2020). Characterisation of protein isoforms encoded by the Drosophila Glycogen Synthase Kinase 3 gene shaggy. *PLOS ONE*, 15(8), e0236679. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236679</u>
- Kotliarova, S., Pastorino, S., Kovell, L. C., Kotliarov, Y., Song, H., Zhang, W., . . . Fine, H. A. (2008). Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition Induces Glioma Cell Death through c-MYC, Nuclear Factor-κB, and Glucose Regulation. *Cancer Research*, 68(16), 6643–6651. <u>https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-0850</u>

- Kovaleva, K., Oleshko, O., Mamontova, E., Yarovaya, O., Zakharova, O., Zakharenko, A., ...
  Salakhutdinov, N. (2019). Dehydroabietylamine Ureas and Thioureas as Tyrosyl-DNA
  Phosphodiesterase 1 Inhibitors That Enhance the Antitumor Effect of Temozolomide on
  Glioblastoma Cells. *Journal of Natural Products*, 82(9), 2443–2450.
  https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b01095
- Langhans, J., Schneele, L., Trenkler, N., von Bandemer, H., Nonnenmacher, L., Karpel-Massler, G., ... Westhoff, M. A. (2017). The effects of PI3K-mediated signalling on glioblastoma cell behaviour. *Oncogenesis*, 6(11). <u>https://doi.org/10.1038/s41389-017-0004-8</u>
- Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., ... Weller, M. (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, 80, 101896. <u>https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101896</u>
- Li, X., Wu, C., Chen, N., Gu, H., Yen, A., Cao, L., ... Wang, L. (2016). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*, 7(22), 33440– 33450. <u>https://doi.org/10.18632/oncotarget.7961</u>
- Losada-Pérez, M., Jarabo, P., Martín-Castro, F. A., & Casas-Tintó, S. (2020). Glioblastoma Models in Drosophila melanogaster. *eLS*, 1–8. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022540.pub2
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.
  K., ... Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <u>https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1</u>
- Maher, E. A. (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & Development*, 15(11), 1311–1333. <u>https://doi.org/10.1101/gad.891601</u>
- Majewska, E., & Szeliga, M. (2016). AKT/GSK3β Signaling in Glioblastoma. Neurochemical Research, 42(3), 918–924. <u>https://doi.org/10.1007/s11064-016-2044-4</u>
- Medikonda, R., Dunn, G., Rahman, M., Fecci, P., & Lim, M. (2020). A review of glioblastoma immunotherapy. *Journal of Neuro-Oncology*, 151(1), 41–53. <u>https://doi.org/10.1007/s11060-020-03448-1</u>
- Moon, E. Y., Lee, G. H., Lee, M. S., Kim, H. M., & Lee, J. W. (2012). Phosphodiesterase inhibitors control A172 human glioblastoma cell death through cAMP-mediated

activation of protein kinase A and Epac1/Rap1 pathways. *Life Sciences*, 90(9–10), 373–380. <u>https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.010</u>

- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., ... Barnholtz-Sloan, J. S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro-Oncology*, 17(suppl 4), iv1-iv62. https://doi.org/10.1093/neuonc/nov189
- Pandey, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human Disease Models in Drosophila melanogaster and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, 63(2), 411–436. https://doi.org/10.1124/pr.110.003293
- Papadopoulou, D., Bianchi, M. W., & Bourouis, M. (2004). Functional Studies of Shaggy/Glycogen Synthase Kinase 3 Phosphorylation Sites in Drosophila melanogaster.
  Molecular and Cellular Biology, 24(11), 4909–4919. https://doi.org/10.1128/mcb.24.11.4909-4919.2004
- Poças, G. M., Domingos, P. M., & Mirth, C. K. (2020). Quantification of Macronutrients Intake in a Thermogenetic Neuronal Screen using *Drosophila* Larvae. *Journal of Visualized Experiments*, (160). <u>https://doi.org/10.3791/61323</u>
- Portela, M., Mitchell, T., & Casas-Tintó, S. (2020). Cell to cell communication mediates glioblastoma progression in Drosophila. *Biology Open*. Published. <u>https://doi.org/10.1242/bio.053405</u>
- Portela, M., Segura-Collar, B., Argudo, I., Sáiz, A., Gargini, R., Sánchez-Gómez, P., & Casas-Tintó, S. (2018). Oncogenic dependence of glioma cells on kish/TMEM167A regulation of vesicular trafficking. *Glia*, 67(2), 404–417. <u>https://doi.org/10.1002/glia.23551</u>
- Portela, M., Venkataramani, V., Fahey-Lozano, N., Seco, E., Losada-Perez, M., Winkler, F., & Casas-Tintó, S. (2019). Glioblastoma cells vampirize WNT from neurons and trigger a JNK/MMP signaling loop that enhances glioblastoma progression and neurodegeneration. *PLOS Biology*, *17*(12), e3000545. <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000545">https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000545</a>
- Qin, L. S., Yu, Z. Q., Zhang, S. M., Sun, G., Zhu, J., Xu, J., ... Fu, L. S. (2013). The short chain cell-permeable ceramide (C6) restores cell apoptosis and perifosine sensitivity in cultured glioblastoma cells. *Molecular Biology Reports*, 40(10), 5645–5655. <u>https://doi.org/10.1007/s11033-013-2666-4</u>

- Ravnskjaer, K., Madiraju, A., & Montminy, M. (2015). Role of the cAMP Pathway in Glucose and Lipid Metabolism. *Metabolic Control*, 29–49. <u>https://doi.org/10.1007/164\_2015\_32</u>
- Read, R. D. (2011). Drosophila melanogaster as a model system for human brain cancers. *Glia*, 59(9), 1364–1376. <u>https://doi.org/10.1002/glia.21148</u>
- Read, R. D., Cavenee, W. K., Furnari, F. B., & Thomas, J. B. (2009). A Drosophila Model for EGFR-Ras and PI3K-Dependent Human Glioma. *PLoS Genetics*, 5(2), e1000374. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000374</u>
- Riabinina, O., & Potter, C. J. (2016). The Q-System: A Versatile Expression System for Drosophila. *Methods in Molecular Biology*, 53–78. <u>https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6371-3\_3</u>
- Safitri, D., Harris, M., Potter, H., Yan Yeung, H., Winfield, I., Kopanitsa, L., ... Ladds, G. (2020). Elevated intracellular cAMP concentration mediates growth suppression in glioma cells. *Biochemical Pharmacology*, 174, 113823. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113823
- Segura-Collar, B., Gargini, R., Tovar-Ambel, E., Hernández-SanMiguel, E., Epifano, C., Pérez de Castro, I., ... Sánchez-Gómez, P. (2020). The EGFR-TMEM167A-p53 Axis Defines the Aggressiveness of Gliomas. *Cancers*, 12(1), 208. <u>https://doi.org/10.3390/cancers12010208</u>
- Shahcheraghi, S. H., Tchokonte-Nana, V., Lotfi, M., Lotfi, M., Ghorbani, A., & Sadeghnia, H.
  R. (2020). Wnt/beta-catenin and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathways in Glioblastoma: Two Main Targets for Drug Design: A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 26(15), 1729–1741. <u>https://doi.org/10.2174/1381612826666200131100630</u>
- Sim, H. W., Morgan, E. R., & Mason, W. P. (2018). Contemporary management of high-grade gliomas. CNS Oncology, 7(1), 51–65. <u>https://doi.org/10.2217/cns-2017-0026</u>
- Sinning, M. (2017). CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES CEREBRALES. Revista Médica Clínica Las Condes, 28(3), 339–342. <u>https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2017.05.002</u>
- Sonnenfeld, M. J. (2009). GAL4/UAS Expression System. *Encyclopedia of Neuroscience*, 1662–1666. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2\_1904</u>

- Soomro, S. H., Ting, L. R., Qing, Y. Y., & Ren, M. (2017). Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations. JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association, 67(9), 1410–1414.
- Stocker, H., & Gallant, P. (2008). Getting Started. *Methods in Molecular Biology*, 27–44. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1\_2
- Su, T. T. (2019). Drug screening in Drosophila ; why, when, and when not? Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology, 8(6). https://doi.org/10.1002/wdev.346
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23(10), 1985–1996. https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-14-0275
- Trostnikov, M. V., Veselkina, E. R., Krementsova, A. V., Boldyrev, S. V., Roshina, N. V., & Pasyukova, E. G. (2020). Modulated Expression of the Protein Kinase GSK3 in Motor and Dopaminergic Neurons Increases Female Lifespan in Drosophila melanogaster. *Frontiers in Genetics*, 11. Published. <u>https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00668</u>
- Vasilev, A., Sofi, R., Rahman, R., Smith, S. J., Teschemacher, A. G., & Kasparov, S. (2020). Using Light for Therapy of Glioblastoma Multiforme (GBM). *Brain Sciences*, 10(2), 75. https://doi.org/10.3390/brainsci10020075
- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., ... Hayes, D. N. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110. <u>https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020</u>
- Wirsching, H. G., Galanis, E., & Weller, M. (2016). Glioblastoma. Handbook of Clinical Neurology, 381–397. <u>https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802997-8.00023-2</u>
- Yang, K., Tang, X., Xu, F., Liu, J., Tan, Y., Gao, L., ... Chen, Q. (2020). PI3K/mTORC1/2 inhibitor PQR309 inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Oncology Reports*. Published. <u>https://doi.org/10.3892/or.2020.7472</u>
- Zhou, A., Lin, K., Zhang, S., Chen, Y., Zhang, N., Xue, J., ... Huang, S. (2016). Nuclear GSK3β promotes tumorigenesis by phosphorylating KDM1A and inducing its deubiquitylation by USP22. *Nature Cell Biology*, *18*(9), 954–966. https://doi.org/10.1038/ncb3396

Zhou, Y., Wu, W., Bi, H., Yang, D., & Zhang, C. (2020). Glioblastoma precision therapy: From the bench to the clinic. *Cancer Letters*, 475, 79–91. <u>https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.027</u>