



# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **Grado en Biotecnología**

### **TÍTULO DEL TRABAJO**

EFECTO DEL ESTRÉS LUMÍNICO Y DIETA RICA  
EN GRASA EN EL DESARROLLO DE  
GLIOBLASTOMA Y ALZHEIMER EN LA  
DESCENDENCIA DE *DROSOPHILA*  
*MELANOGASTER*

Autor/es: **Michelle Eloise Gutiérrez Le Barbier**

Villaviciosa de Odón, *Junio 2022*

Título del Trabajo: Efecto del estrés lumínico y dieta rica en grasa en el desarrollo de Glioblastoma y Alzheimer en la descendencia de *Drosophila melanogaster*

Este trabajo se ha realizado en el Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), en el grupo de Modelos de Enfermedades Humanas en Drosophila (MEHD) liderado por Sergio Casas Tintó. Su seguimiento se ha llevado a cabo por la Universidad Europea de Madrid.



Tutor: Dra. Beatriz Matallanas. Universidad Europea de Madrid

Co-tutor: Dr. Sergio Casas Tintó. Instituto de Salud Carlos III

## Índice

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
2.1 IMPORTANCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN EL ORGANISMO .....	5
2.2 GLIOBLASTOMA .....	7
2.3 ALZHEIMER .....	8
2.4 DROSOPHILA MELANOGASTER EN INVESTIGACIÓN GENÉTICA.....	8
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
4.1 ESTUDIO DE ESTRÉS POR DIETA RICA EN GRASA EN GLIOBLASTOMA .....	11
4.1.1 Puesta a punto de la papilla con dieta rica en grasa.....	11
4.1.2 Inducción del estrés por dieta rica en grasa.....	12
4.1.3 Cruces para el desarrollo del Glioblastoma.....	12
4.1.4 Disección e Inmunomarcaje de cerebro larva D. melanogaster .....	13
4.1.5 Microscopía confocal cerebro larva D. melanogaster y análisis de imagen .....	14
4.1.6 Análisis estadístico del número de células gliales y volumen de la membrana.....	14
4.2 ESTUDIO DE ESTRÉS LUMÍNICO EN ALZHEIMER.....	14
4.2.1 Inducción de estrés lumínico .....	14
4.2.2 Cruces para el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer.....	15
4.2.3 Análisis Geotaxis Negativa.....	16
4.2.4 Análisis Estadístico de la Locomoción .....	17
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
5.1 ESTUDIO DE ESTRÉS POR DIETA RICA EN GRASA EN GLIOBLASTOMA.....	17
5.1.1 Puesta a punto de la papilla con dieta rica en grasa.....	17
5.1.2 Número y volumen de células gliales .....	18
5.2 ESTUDIO DE ESTRÉS LUMÍNICO EN ALZHEIMER.....	19
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>22</b>
6.1 ESTUDIO DE ESTRÉS POR DIETA RICA EN GRASA EN GLIOBLASTOMA.....	22
6.2 ESTUDIO DE ESTRÉS LUMÍNICO EN ALZHEIMER.....	24
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>26</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>27</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>33</b>
9.1 CONTRIBUCIÓN AL MEDIO AMBIENTE .....	33
9.2 NÚMERO Y VOLUMEN DE CÉLULAS GLIALES GRAPHPAD PRISM.....	33
9.3 GRÁFICAS DE LÍNEAS DE REGRESIÓN DEL ANÁLISIS GN EN ALZHEIMER GRAPHPAD PRISM .....	35

# **Efecto del estrés lumínico y dieta rica en grasa en el desarrollo de Glioblastoma y Alzheimer en la descendencia de *Drosophila melanogaster***

## **1.RESUMEN**

Enfermedades como el Glioblastoma (GB) y la Enfermedad de Alzheimer (EA) son multifactoriales. Esto da lugar a heterogeneidad en la evolución de la enfermedad entre los pacientes y su resistencia ante las enfermedades, pero los mecanismos que determinan la heterogeneidad son desconocidos. Los factores ambientales modulan diferentes mecanismos epigenéticos que pueden ser heredados y alteran la expresión genética sin modificar la secuencia de ADN. Diferentes estudios muestran el efecto del estrés lumínico y de la dieta rica en grasa (High Fat Diet (HFD)) en el desarrollo de enfermedades, sin embargo, no se sabe qué efecto tienen en la siguiente generación. En este proyecto se propone estudiar el efecto del estrés de dieta rica en grasa en el desarrollo del GB en la descendencia y el estrés lumínico en el desarrollo de la EA en la descendencia mediante el empleo de *Drosophila melanogaster* como modelo experimental.

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran que el estrés lumínico da lugar a una evolución más rápida de la neurodegeneración de la EA en los descendientes de hembras portadoras de A $\beta$ 42. Por otro lado, se han optimizado las condiciones de dieta rica en grasa en *D. melanogaster* añadiendo a la papilla alimentaria aceite de coco virgen al 10%. En cuanto a los resultados obtenidos sobre el desarrollo del GB, no se ha podido dilucidar ninguna suposición, sin embargo, se han planteado diversas soluciones, métodos experimentales e hipótesis para posteriores estudios.

### **Palabras clave**

Factores ambientales; estrés; descendencia; Glioblastoma; Enfermedad de Alzheimer.



## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Importancia de los factores ambientales en el organismo

Los factores ambientales junto con la interacción de múltiples genes dan como resultado a las enfermedades multifactoriales [Instituto Nacional del Cáncer (<https://www.cancer.gov/espanol>)]. Es el caso de enfermedades neurodegenerativas como el Glioblastoma (GB) y la Enfermedad del Alzheimer (EA), se da un deterioro funcional y la muerte de forma muy heterogénea entre los individuos. Los mecanismos que determinan la heterogeneidad de los resultados siguen siendo en gran parte desconocidos.

Parte de la variabilidad genética existente entre individuos se origina en el proceso de meiosis, gracias al cual cada gameto es diferente. Junto a ello, la herencia no basada en secuencias del ADN y la influencia de factores del genoma (como el microbioma) contribuyen a la heterogeneidad de los individuos [1]. Esta herencia no basada en secuencias del ADN es la herencia epigenética transgeneracional [2], se trata de la transmisión de marcas epigenéticas de un organismo al siguiente. Estas marcas, controlan la expresión génica sin modificar la secuencia de ADN en respuesta a factores ambientales [3]. Existen diversos tipos de estrés ambiental que afectan a la fisiología de un organismo y a su descendencia como la privación del sueño, la temperatura, el estrés lumínico o la dieta.

Este estudio es una continuación de las investigaciones del laboratorio de Modelos de Enfermedades Humanas en *Drosophila melanogaster* (MEHD) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), quienes están estudiando las modificaciones genéticas o epigenéticas que definen la resistencia de las células cerebrales al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, en concreto al GB y a la EA. Para ello, han estudiado el efecto del estrés lumínico en el desarrollo del GB en la descendencia de *D. melanogaster* donde, entre los diferentes tipos de marcas epigenéticas, encontraron diferencias significativas en algunos tipos de microARN (miARN). Quisieron continuar el estudio analizando el efecto del estrés por dieta rica en grasa en el desarrollo del GM y el efecto del estrés lumínico en el desarrollo de la EA en la descendencia de *D. melanogaster*.

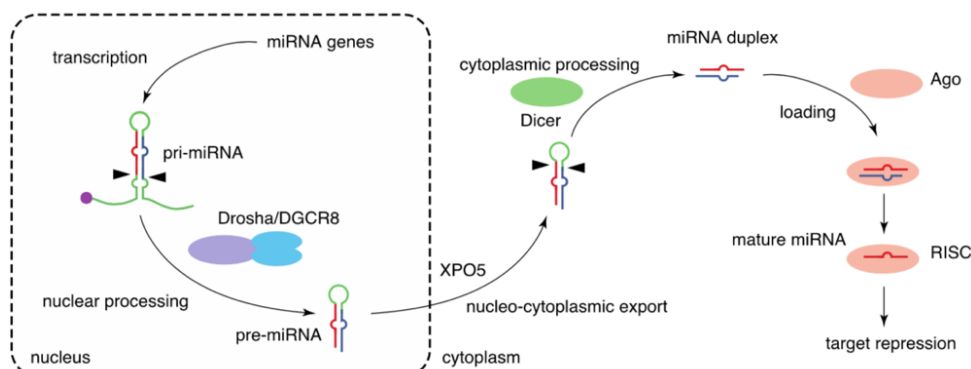
El estrés lumínico y de dieta rica en grasa son los factores ambientales en los que se centra este proyecto de fin de grado y los cuales se describen a continuación.

- **Estrés lumínico**

Los ritmos circadianos son oscilaciones endógenas en el comportamiento, las funciones fisiológicas y las actividades celulares que se coordinan con los ciclos externos de luz (día/noche). Estos ritmos se ven afectados con la edad y la interrupción del sueño nocturno, a su vez, la pérdida de los ritmos circadianos contribuye al envejecimiento [4].

La alteración de los ritmos circadianos da lugar a una mayor neurodegeneración y deterioro de la movilidad, mayor producción de especies de oxígeno reactivo (ROS), menor capacidad de responder a los cambios homeostáticos [4] y está implicado en la carcinogénesis [5, 6]. Estos cambios producen alteraciones en la expresión de los diferentes tipos de miARNs, estos patrones de expresión pueden ser heredados y dar lugar a una mayor probabilidad de desarrollo de la enfermedad o una mayor agresividad [7, 8, 9, 10].

Los miARN forman parte, junto con piwi ARN (piARN) y ARN de interferencia (siARN) del ARN no codificante (ncARN), es decir, que no se traduce a proteínas. Los miARN son moléculas que regulan la expresión génica, a nivel postranscripcional. Para su formación (Ilustración 1), en primer lugar, se forman unas horquillas dando lugar a pri-micro-ARN. A continuación, la proteína DROSHA (RNasa tipo III) corta la base de las horquillas formando el pre-micro-ARN que se transporta desde el núcleo al citoplasma. Las horquillas son fragmentadas por la proteína DICER en miARN que se encarga de reconocer la secuencia diana. miARN requiere de una plataforma sobre la cual se puedan unir los factores reguladores llamado Argo2, de esta manera, forman RISC que reconocen las secuencias homólogas de ARN mensajero y bloquean su traducción o facilitan su degradación [11].



*Ilustración Ilustración de la formación de micro ARNs [11]*

- Estrés de dieta rica en grasa

La dieta rica en grasa a nivel metabólico produce una reducción en las tasas de respiración mitocondrial y un aumento de la producción de ROS. Por otro lado, produce un cambio drástico en el perfil de lípidos que se traduce en una disminución de la proporción de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, mientras que se da un aumento de los ácidos grasos poliinsaturados que conduce a una mayor peroxidación, es decir, una mayor degradación oxidativa de los lípidos [12].

Estudios previos en roedores han indicado que la dieta rica en grasa aumenta la proliferación y la resistencia a la quimioterapia del GB [13], así como déficits de memoria en la EA [14]. En *D. melanogaster* disminuye la esperanza de vida y la capacidad de trepar y produce un aumento en la fragmentación del sueño con la edad [15].

## 2.2 Glioblastoma

El GB es una neoplasia primaria maligna que cuenta con una supervivencia media de 14-15 meses con los tratamientos de resección quirúrgica seguida de radioterapia y quimioterapia [16]. Los tumores del encéfalo representan del 85 al 90% de todos los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC), siendo los glioblastomas el 38 % [17]. Los gliomas son un grupo heterogéneo de tumores de las células gliales, entre ellos, los astrocitomas (astrocitos) cuyo tumor más agresivo (nivel IV de la OMS) es el GB [18].

En el 80% de los GB se encuentra una alteración en la señalización de la vía de tirosina quinasas receptoras (RTK), siendo las más comunes el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y las vías PI3K [16], cuyas mutaciones *PI3K<sup>tp110</sup>* [51] y *EGFR<sup>Δ</sup>* [52] se han empleado en este proyecto para dar origen al GB.

EGFR interviene en la mediación de la comunicación entre células, el crecimiento celular, la motilidad, la diferenciación y el metabolismo [19]. La mutación de este gen puede promover una multitud de procesos biológicos pro-oncogénicos, incluida la proliferación celular, la angiogénesis, la inhibición de la apoptosis, la motilidad celular, la adhesión y la metástasis [20]. Por otro lado, la vía PI3K/AKT se activa resultado de la fosforilación de EGFR. Este proceso regula diferentes funciones celulares como la proliferación, la apoptosis, el metabolismo y los ciclos celulares [21].

### 2.3 Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurológico progresivo incurable que se caracteriza por la pérdida de memoria, declive cognitivo y muerte neuronal [22]. Todavía no se sabe la causa que provoca el desarrollo del Alzheimer, pero una característica patológica típica es la formación de placas amiloides (placas seniles o placas neuríticas) [22], las cuales en este proyecto son inducidas en *D. melanogaster* para el desarrollo del Alzheimer.

Las placas amiloideas son depósitos extracelulares del péptido beta amiloide ( $A\beta$ ). Este péptido causa disfunción sináptica y desconectividad de las neuronas que conducen al deterioro cognitivo [23]. El péptido  $A\beta$  deriva de la proteína precursora de amiloide (APP) a través de la escisión secuencial por  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas [24]. La APP se ve modulada en respuesta a una variedad de factores ambientales [25] y cuenta con funciones no vinculadas al Alzheimer como la activación de quinasas [26], la protección contra estrés oxidativo [31] y la actividad antimicrobiana [25] entre otros.

La desregulación de la síntesis, plegamiento y degradación de  $A\beta$  [23] conduce a la formación de fibrillas insolubles [27], seguido de agregados de  $A\beta$  que luego forman las placas amiloides. Además, las vías de degradación de proteínas no detectan ni eliminan por completo el  $A\beta$  acumulado debido a las longitudes variables y los cambios conformacionales asociados [23]. Las isoformas más comunes son  $A\beta 40$  y  $A\beta 42$  denominados así por el número de aminoácidos de su secuencia siendo esta última la más fibrogénica y con tendencia a agregar [27].

### 2.4 *Drosophila melanogaster* en investigación genética

Desde 1910, *D. melanogaster* se ha empleado como excelente modelo de estudio debido a su reducido tamaño, rápido ciclo de vida y gran cantidad de descendientes lo que permite estudiar enfermedades en menor tiempo. Su genoma está completamente secuenciado además de existir poderosas herramientas de mutagénesis dirigida como el sistema binario UAS/Gal4 que permite el estudio de diversas patologías de interés. *D. melanogaster* cuenta con un 60-70% de secuencia conservada con el genoma humano y más del 75 % de los genes causantes de enfermedades en humanos tienen homólogos en *D. melanogaster* [16]. Sumado a esto, este organismo modelo no está sujeto a las leyes éticas ni experimentación animal y supone un bajo coste de mantenimiento.

*D. melanogaster* ha sido un modelo de elección para las investigaciones sobre la dinámica neuronal, la memoria y las disfunciones asociadas con la agregación de  $A\beta$  42 de la EA [23]. Por otro lado, la glía de *D. melanogaster* comparte las características de las neoplasias de vertebrados y se conservan las vías genéticas de la gliomagénesis. Existen ortólogos únicos para genes involucrados en la gliomagénesis, como EGFR (dEGFR) y PIK3CA (dp110) [16], por lo que son un modelo práctico y esencial para el estudio de enfermedades humanas.

### 3. OBJETIVOS

Este proyecto de fin de grado forma parte de un proyecto de mayor amplitud del laboratorio MEHD. El objetivo general del proyecto consiste en estudiar cambios en las marcas epigenéticas de la descendencia que afectan al desarrollo de una enfermedad consecuencia de parentales expuestos a diferentes tipos de estrés ambiental; así como marcas epigenéticas de la descendencia que afectan a diferentes enfermedades consecuencia de parentales expuestos a un solo tipo de estrés.

En concreto, este TFG trata de estudiar si el estrés por dieta rica en grasa en los parentales afecta al número y volumen de células gliales del Glioblastoma en la descendencia. Por otro lado, estudiar si el estrés lumínico en los parentales da lugar a cambios en la locomoción de la descendencia con la Enfermedad de Alzheimer. Esto supone los primeros pasos para posteriormente estudiar las marcas epigenéticas.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el presente trabajo, *D. melanogaster* se ha mantenido en condiciones basales de 12 horas luz/oscuridad en incubadores [Cámaras de Ambiente Controlado (IBERCEX S.L.) Madrid, España] a 25 °C y en tubos de ensayo con papilla de levadura, harina de maíz, glucosa, agar y ácido propiónico.

Para el desarrollo de las enfermedades, se ha empleado el sistema binario de expresión Gal4/UAS (Ilustración 2). Gal4 es un factor de transcripción que se coloca en 3' de un promotor que determina el tejido específico en el que se expresará *Gal4*. Por otro lado, la proteína resultante GAL4 se une a la secuencia activadora *UAS* (Upstream Activating Sequence) de forma específica. Dado que GAL4 no tiene dianas endógenas en *D. melanogaster* [28], esta unión, activa la transcripción del transgén que se encuentran en 5' de *UAS*. De esta forma, el transgén sólo se activa en el tejido de interés.

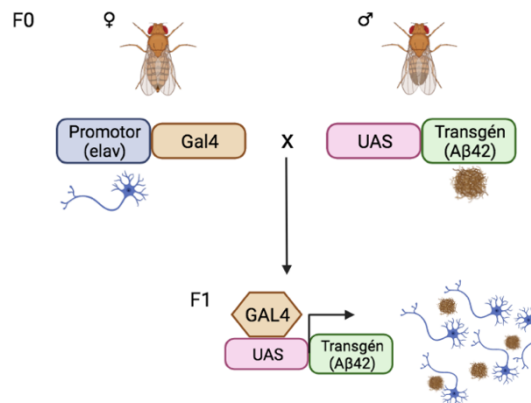


Ilustración 2 Sistema binario Gal4/UAS en el que se muestra el ejemplo de *elav*GAL4/UAS-*Aβ42* [Elaboración propia Biorrender]

Además de este sistema, se emplearon cromosomas balanceadores debido a sus diferentes funciones:

- Previenen la recombinación homóloga durante la meiosis gracias a regiones invertidas, lo que permite mantener el cromosoma mutado intacto durante generaciones. [29].
- Evita la pérdida de la mutación a lo largo de las generaciones. Los balanceadores portan mutaciones letales o estériles (Ilustración 3) que impide el desarrollo del organismo que porta balanceadores en homocigosis, aumentando así la probabilidad de la descendencia con la mutación de interés [29].
- Facilita genotipar los stocks sin tener que realizar análisis genéticos. Ya que portan marcadores visibles dominantes para el seguimiento de la herencia en los cruces, como *Cyo* (alas curvas) (Ilustración 3) o *Tm6b* (extra-quetas en hombros de adulto y larvas de menor tamaño) [30].

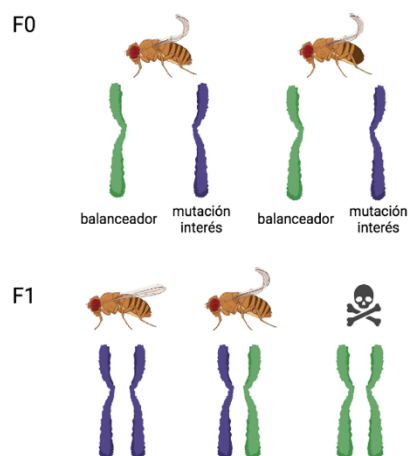


Ilustración 3 Representación de los balanceadores y marcador *Cyo* [Elaboración propia Biorrender].

En las cepas empleadas de este estudio (Tabla 1) fueron imprescindibles los balanceadores y el sistema binario Gal4/UAS.

Cepa	
$w; \frac{elavGal4}{Cyo}; \frac{+}{+}$	<p>El cromosoma I cuenta con el gen <i>White</i> (<i>w</i>) cuya mutación da lugar a ojos de color blanco.</p> <p>En el cromosoma II tiene <i>elav Gal4</i>, <i>elav</i> es un promotor específico de neuronas y en el cromosoma homólogo se encuentra el balanceador <i>Cyo</i>.</p> <p>El cromosoma III es silvestre.</p>
$w; \frac{UAS - PI3K dp110: UAS - EGFR\lambda}{UAS - PI3K dp110: UAS - EGFR\lambda}; \frac{+}{+}$	<p>En el cromosoma II cuenta en homocigosis con los oncogenes <i>UAS-PI3K<sup>dp110</sup>: UAS-EGFR<sup>λ</sup></i> (OnX) para el desarrollo del GB.</p>
$w; \frac{UAS - CD8 - GFP}{Cyo}; \frac{Repo Gal4}{TM6B}$	<p>En el cromosoma II tiene <i>UAS-CD8-GFP</i>, CD8 es una proteína transmembrana que se emplea con GFP (Green Fluorescent Protein) para observar las membranas verdes cuando se aplica fluorescencia. Mientras que en el cromosoma homólogo encontramos el balanceador <i>Cyo</i>.</p> <p>En el cromosoma III se encuentra <i>repoGal4</i>, <i>repo</i> que es el promotor específico de las células gliales. En el cromosoma homólogo encontramos el balanceador <i>TM6b</i>, el único balanceador observable en larvas.</p>
$w; \frac{UAS - A\beta42}{Cyo}; \frac{UAS - CD8 - GFP}{TM6B}$	<p>En el cromosoma II cuenta con <i>UAS-Aβ42</i> que da lugar al péptido cuya acumulación da lugar a la EA.</p>
$w; \frac{UAS - LacZ}{UAS - LacZ}; \frac{+}{+}$	<p>En el cromosoma II tiene <i>UAS-LacZ</i>, <i>LacZ</i> es un gen reportero que se emplea como control.</p>
<p>; se empleado para separar pares de cromosomas</p> <p>/ se empleado para separar cromosomas homólogos</p>	

Tabla 1 Cepas transgénicas de *D. melanogaster* empleadas y las funciones de las distintas construcciones genéticas.

## 4.1 Estudio de estrés por dieta rica en grasa en Glioblastoma

### 4.1.1 Puesta a punto de la papilla con dieta rica en grasa

Se estudiaron dos concentraciones de aceite de coco virgen [Aceite de coco virgen (Laboratorios Almond, S.L.) Murcia, España] compuesto por un 94,5% de ácidos grasos saturados. En primer lugar, se estudió al 20% aplicándose una concentración de 0,945g/ml de grasas saturadas de aceite de coco. Para estudiar al 10% de dieta rica en grasa se empleó

una concentración de 0,57g/ml de grasas saturadas de aceite de coco que se mezcló con la papilla.

#### 4.1.2 Inducción del estrés por dieta rica en grasa

Se han introducido hembras y machos adultos  $w$ ;  $\frac{UAS-CD8-GFP}{Cyo}$ ;  $\frac{repo Gal4}{TM6B}$  en tubos con dieta rica en grasa 10% y 20%. La generación resultante es la que ha sido expuesta al estrés ya que el período de mayor alimentación de *D. melanogaster* es el larvario.

Para el control se han empleado tubos con papilla sin aceite de coco virgen.

#### 4.1.3 Cruces para el desarrollo del Glioblastoma

Se han llevado a cabo 8 cruces (Tabla 2) para inducir el desarrollo del GB y estudiar el estrés por dieta rica en grasa.

Desarrollo de Glioblastoma	Control de Glioblastoma
$\text{♀}^V w; \frac{UAS-CD8-GFP}{Cyo}; \frac{repo Gal4}{TM6B} \text{ (HFD)} \times \text{♂} w; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR}{UAS-PI3K:UAS-EGFR}; \frac{+}{+}$ <b>F<sub>1</sub>)</b> * $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{UAS-PI3K:UAS-EGFR}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{UAS-PI3K:UAS-EGFR}; \frac{+}{TM6B}$ $w; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR}{Cyo}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR\lambda}{Cyo}; \frac{+}{TM6B}$	$\text{♀}^V w; \frac{UAS-CD8-GFP}{Cyo}; \frac{repo Gal4}{TM6B} \text{ (HFD)} \times \text{♂} w; \frac{LacZ}{LacZ}; \frac{+}{+}$ <b>F<sub>1</sub>)</b> * $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{LacZ}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{LacZ}; \frac{+}{TM6B}$ $w; \frac{LacZ}{Cyo}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{LacZ}{Cyo}; \frac{+}{TM6B}$
$\text{♀}^V w; \frac{UAS-CD8-GFP}{Cyo}; \frac{repo Gal4}{TM6B} \times \text{♂} w; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR}{UAS-PI3K:UAS-EGFR}; \frac{+}{+}$ <b>F<sub>1</sub>)</b> * $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{UAS-PI3K:UAS-EGFR}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{UAS-PI3K:UAS-EGFR}; \frac{+}{TM6B}$ $w; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR}{Cyo}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR}{Cyo}; \frac{+}{TM6B}$	$\text{♀}^V w; \frac{UAS-CD8-GFP}{Cyo}; \frac{repo Gal4}{TM6B} \times \text{♂} w; \frac{LacZ}{LacZ}; \frac{+}{+}$ <b>F<sub>1</sub>)</b> * $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{LacZ}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{LacZ}; \frac{+}{TM6B}$ $w; \frac{LacZ}{Cyo}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{LacZ}{Cyo}; \frac{+}{TM6B}$
$\text{♀}^V w; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR}{UAS-PI3K:UAS-EGFR}; \frac{+}{+} \times \text{♂} w; \frac{UAS-CD8-GFP}{Cyo}; \frac{repo Gal4}{TM6B} \text{ (HFD)}$ <b>F<sub>1</sub>)</b> * $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{UAS-PI3K:UAS-EGFR}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{UAS-PI3K:UAS-EGFR}; \frac{+}{TM6B}$ $w; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR}{Cyo}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR}{Cyo}; \frac{+}{TM6B}$	$\text{♀}^V w; \frac{LacZ}{LacZ}; \frac{+}{+} \times \text{♂} w; \frac{UAS-CD8-GFP}{Cyo}; \frac{repo Gal4}{TM6B} \text{ (HFD)}$ <b>F<sub>1</sub>)</b> * $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{LacZ}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{LacZ}; \frac{+}{TM6B}$ $w; \frac{LacZ}{Cyo}; \frac{Repo Gal4}{+}$ $w; \frac{LacZ}{Cyo}; \frac{+}{TM6B}$



$\text{♀}^V W ; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR}{UAS-PI3K:UAS-EGFR} ; \frac{+}{+} \times \text{♂} W ; \frac{UAS-CD8-GFP}{Cyo} ; \frac{repo\ Gal4}{TM6B}$ <p><b>F<sub>1</sub>)</b> * <math>W ; \frac{UAS-CD8-GFP}{UAS-PI3K:UAS-EGFR} ; \frac{repo\ Gal4}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{UAS-CD8-GFP}{UAS-PI3K:UAS-EGFR} ; \frac{+}{TM6B}</math></p> <p><math>W ; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR}{Cyo} ; \frac{repo\ Gal\ 4}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{UAS-PI3K:UAS-EGFR}{Cyo} ; \frac{+}{TM6B}</math></p>	$\text{♀}^V W ; \frac{LacZ}{LacZ} ; \frac{+}{+} \times \text{♂} W ; \frac{UAS-CD8-GFP}{Cyo} ; \frac{repo\ Gal4}{TM6B}$ <p><b>F<sub>1</sub>)</b> * <math>W ; \frac{UAS-CD8-GFP}{LacZ} ; \frac{repo\ Gal4}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{UAS-CD8-GFP}{LacZ} ; \frac{+}{TM6B}</math></p> <p><math>W ; \frac{LacZ}{Cyo} ; \frac{repo\ Gal\ 4}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{LacZ}{Cyo} ; \frac{+}{TM6B}</math></p>
<p>* Genotipo experimental el cual porta el sistema binario Gal/UAS. El resto de los genotipos son controles los cuales no portan uno de los componentes del sistema binario. Las <i>D. melanogaster</i> adultas que porten alas curvas o extra-quetas se separaron en diferentes tubos.</p>	

Tabla 2 Cruces llevados a cabo para el desarrollo del glioblastoma

Con la aparición de pupas, la F<sub>0</sub> (parentales) se desechó y la F<sub>1</sub> (primera descendencia) se trasladó a nuevos tubos para evitar mezclarse con la F<sub>2</sub> (segunda descendencia).

#### 4.1.4 Disección e Inmunomarcaje de cerebro larva *D. melanogaster*

Previamente se ha descrito que la expresión de EGFR y de PI3K en las células gliales aumenta el número de estas [33, 34] y del volumen de su membrana [34]. Para estudiar el número de las células gliales llevamos a cabo un inmunomarcaje del núcleo y para el estudio del volumen se seleccionan aquellas larvas con *UAS-CD8-GFP*.

Para el mantenimiento de los tejidos durante las disecciones, se ha empleado el tampón fosfato salino (PBS). Se han seleccionado aquellas que portan el *UAS-CD8-GFP* mediante un microscopio de fluorescencia y se han descartado aquellas portadoras del balanceador TM6b (fenotípicamente son larvas de menor tamaño).

Para las disecciones, se secciona transversalmente el cuerpo de la larva y se desecha la parte inferior de esta. A continuación, se empuja la cabeza hacia el interior de la sección para que la pared interna quede expuesta al exterior.

La fijación se llevó a cabo con formaldehído 4% (FA) durante 25 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados consecutivos con PBT (PBS + tritón 0,3%) en agitación lenta durante 10 minutos cada uno y a temperatura ambiente. Finalmente, se incubaron en solución de bloqueo (PBT 0,3% + BSA 5%) a 4°C.

Para el Inmunomarcaje, se empleó el anticuerpo primario mouse anti-repo en solución bloqueo (1:200) y se incubó a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados con PBT y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo 546 anti-mouse. Se preparó en solución de bloqueo (1:200), durante dos horas en agitación, oscuridad y a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBT y finalmente se incubó con el medio de montaje (Vectashield mounting medium) con DAPI a 4°C.

En cuanto al montaje, se realizó en un portaobjetos aplicándose el medio de montaje (Vectashield mounting medium) con DAPI y se almacenó a 4°C.

#### 4.1.5 Microscopía confocal cerebro larva *D. melanogaster* y análisis de imagen

Para la toma de imágenes se empleó un microscopio confocal Leica SP5 (Leica Microsystems), tomadas en un objetivo 20X en inmersión, cada 1,5µm en el eje Z.

El análisis se llevó a cabo mediante el empleo del software IMARIS ([www.bitplane.com](http://www.bitplane.com)) que permite cuantificar la cantidad de señal fluorescente de una imagen 3D tomada mediante microscopía confocal. Gracias a ello, es posible cuantificar el número de células que contienen un marcador y el volumen que ocupa la señal fluorescente de dicha imagen. Posteriormente mediante Leica LAS X LS se editaron y guardaron las imágenes.

#### 4.1.6 Análisis estadístico del número de células gliales y volumen de la membrana

Para realizar los análisis estadísticos de los datos obtenidos se empleó el programa GraphPadPrism 5 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Al ver que los datos obtenidos no seguían una distribución normal debido a que contaba con una n menor de 6, se llevó a cabo un análisis de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn de comparaciones múltiples para comparar los diferentes genotipos e identificar diferencias significativas. El valor mínimo escogido para considerar una diferencia como estadísticamente significativa fue de  $p < 0,05$ .

## 4.2 Estudio de estrés lumínico en Alzheimer

### 4.2.1 Inducción de estrés lumínico

Datos previos de este laboratorio (MEHD) han demostrado que las alteraciones inducidas por la luz se heredan específicamente por vía materna, por esta razón sólo se sometió al estrés lumínico a hembras vírgenes.

Para llevar a cabo este estrés, se han recolectado en un tubo con papilla hembras vírgenes de *D. melanogaster*  $w; \frac{elav\ Gal4}{Cyo}$ , hembras vírgenes  $w; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo}; \frac{UAS-CD8-GFP}{TM6B}$  y hembras vírgenes  $w; \frac{LacZ}{LacZ}; \frac{+}{+}$  que han sido estresadas con luz permanente 24h durante 7 días y una temperatura constante de 25°C en una posición perpendicular a la luz.

#### 4.2.2 Cruces para el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer

Se han llevado a cabo 8 cruces (Tabla 3) para inducir el desarrollo de la EA y estudiar el efecto del estrés lumínico.

Desarrollo de Alzheimer	Control de Alzheimer
$\text{♀}^V w; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo}; \frac{UAS-CD8-GFP}{TM6B} \text{ (Luz)} \times \text{♂} w; \frac{elav\ Gal4}{Cyo}; \frac{+}{+}$  <b>F<sub>1</sub>)</b> * $w; \frac{UAS-A\beta42}{elav\ Gal4}; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}$ $w; \frac{UAS-A\beta42}{elav\ Gal4}; \frac{+}{TM6B}$ $w; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo}; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}$ $w; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo}; \frac{+}{TM6B}$ $w; \frac{elav\ Gal4}{Cyo}; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}$ $w; \frac{elav\ Gal4}{Cyo}; \frac{+}{TM6B}$	$\text{♀}^V w; \frac{LacZ}{LacZ}; \frac{+}{+} \text{ (Luz)} \times \text{♂} w; \frac{elav\ Gal4}{Cyo}; \frac{+}{+}$  <b>F<sub>1</sub>)</b> * $w; \frac{LacZ}{elav\ Gal4}; \frac{+}{+}$ $w; \frac{LacZ}{Cyo}; \frac{+}{+}$
$\text{♀}^V w; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo}; \frac{UAS-CD8-GFP}{TM6B} \times \text{♂} w; \frac{elav\ Gal4}{Cyo}; \frac{+}{+}$  <b>F<sub>1</sub>)</b> * $w; \frac{UAS-A\beta42}{elav\ Gal4}; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}$ $w; \frac{UAS-A\beta42}{elav\ Gal4}; \frac{+}{TM6B}$ $w; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo}; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}$ $w; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo}; \frac{+}{TM6B}$ $w; \frac{elav\ Gal4}{Cyo}; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}$ $w; \frac{elav\ Gal4}{Cyo}; \frac{+}{TM6B}$	$\text{♀}^V w; \frac{LacZ}{LacZ}; \frac{+}{+} \times \text{♂} w; \frac{elav\ Gal4}{Cyo}; \frac{+}{+}$  <b>F<sub>1</sub>)</b> * $w; \frac{LacZ}{elav\ Gal4}; \frac{+}{+}$ $w; \frac{LacZ}{Cyo}; \frac{+}{+}$

$\text{♀}^V W ; \frac{elavGal4}{Cyo} ; \frac{+}{+} \text{ (Luz) } \times \text{♂} W ; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo} ; \frac{UAS-CD8-GFP}{TM6B}$ <p><b>F<sub>1</sub>)</b> * <math>W ; \frac{UAS-A\beta42}{elavGal4} ; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{UAS-A\beta42}{elavGal4} ; \frac{+}{TM6B}</math></p> <p><math>W ; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo} ; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo} ; \frac{+}{TM6B}</math></p> <p><math>W ; \frac{elavGal4}{Cyo} ; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{elavGal4}{Cyo} ; \frac{+}{TM6B}</math></p>	$\text{♀}^V W ; \frac{elavGal4}{Cyo} ; \frac{+}{+} \text{ (Luz) } \times \text{♂} W ; \frac{LacZ}{LacZ} ; \frac{+}{+}$ <p><b>F<sub>1</sub>)</b> * <math>W ; \frac{elavGal4}{LacZ} ; \frac{+}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{LacZ}{Cyo} ; \frac{+}{+}</math></p>
$\text{♀}^V W ; \frac{elavGal4}{Cyo} ; \frac{+}{+} \times \text{♂} W ; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo} ; \frac{UAS-CD8-GFP}{TM6B}$ <p><b>F<sub>1</sub>)</b> * <math>W ; \frac{UAS-A\beta42}{elavGal4} ; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{UAS-A\beta42}{elavGal4} ; \frac{+}{TM6B}</math></p> <p><math>W ; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo} ; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{UAS-A\beta42}{Cyo} ; \frac{+}{TM6B}</math></p> <p><math>W ; \frac{elavGal4}{Cyo} ; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{elavGal4}{Cyo} ; \frac{+}{TM6B}</math></p>	$\text{♀}^V W ; \frac{elavGal4}{Cyo} ; \frac{+}{+} \times \text{♂} W ; \frac{LacZ}{LacZ} ; \frac{+}{+}$ <p><b>F<sub>1</sub>)</b> * <math>W ; \frac{elavGal4}{LacZ} ; \frac{+}{+}</math></p> <p><math>W ; \frac{LacZ}{Cyo} ; \frac{+}{+}</math></p>
<p>* Genotipo experimental el cuál porta el sistema binario Gal/UAS. El resto de los genotipos son controles los cuales no portan uno de los componentes del sistema binario. Las <i>D. melanogaster</i> adultas que porten alas curvas o extra-quetas se separaron en diferentes tubos.</p>	

Tabla 3 Cruces llevados a cabo para el desarrollo de Alzheimer

Con la aparición de pupas, la F<sub>0</sub> se desechó para evitar mezclar F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub>. Durante dos días se recolectaron *D. melanogaster* adultas F<sub>1</sub> para evitar que hubiera una diferencia en el envejecimiento entre estas. F<sub>1</sub> se fue cambiando a tubos nuevos regularmente para evitar mezclar la F<sub>1</sub> y la F<sub>2</sub>.

#### 4.2.3 Análisis Geotaxis Negativa

La geotaxis negativa (NG) es la capacidad de las moscas para moverse verticalmente cuando se asustan. Es una medida importante del comportamiento locomotor que disminuye con la edad en *D. melanogaster* y comúnmente se utiliza en el estudio de diferentes enfermedades del SNC y trastornos del neurodesarrollo [32]. La locomoción se ve afectada por la enfermedad del Alzheimer debido a la disminución del número de sinapsis [23]. Por ello, se puede estudiar la evolución de la enfermedad mediante la geotaxis negativa [49].

Se trata de un experimento a ciegas en el que se emplearon tubos sin papilla numerados y con una marca a los 5 cm.

Se procedió golpeando cada tubo en la parte inferior 3 veces y se anotaron aquellas que superaron la marca de los 5 cm tras 8 segundos. Para este proceso, se realizaron 8 replicados por cada genotipo y se llevó a cabo tres días por semana [proceso puesto a punto previamente en el laboratorio MEHD].

Mediante las anotaciones, se realizó la media de las 8 repeticiones y se calculó el porcentaje en función del total de moscas para obtener el porcentaje de locomoción. A continuación, se realizaron gráficas del porcentaje de locomoción en función de los días de vida ya que es importante el periodo de vida para la evolución de la EA.

#### 4.2.4 Análisis Estadístico de la Locomoción

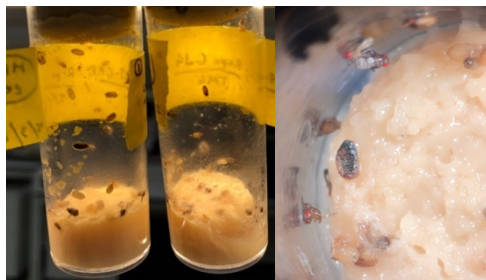
Mediante el programa GraphPadPrism 5 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) se calcularon las líneas de regresión para obtener las pendientes de los resultados. De esta forma se obtuvieron gráficas de la locomoción respecto a los días en los que se hace la prueba ya que aquí no es tan importante conocer el envejecimiento sino la pendiente. De esta forma, conociendo la pendiente se pueden comparar dos genotipos de interés.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Estudio de estrés por dieta rica en grasa en glioblastoma

#### 5.1.1 Puesta a punto de la papilla con dieta rica en grasa

La papilla con el 20% de aceite de coco virgen supuso una elevada mortalidad, lo que derivó en un menor número de larvas las cuales no llegaron a salir de la pupa (Ilustración 4). En cuanto a la papilla con el 10% de aceite de coco virgen, hubo una menor mortalidad y un mayor número de larvas de las cuales un porcentaje salió de las pupas. Por esta razón, se empleó el 10% de aceite de coco virgen para llevar a cabo los experimentos de estrés por dieta rica en grasa.



*Ilustración 4 Imágenes tomadas en el laboratorio de los tubos de ensayo con aceite de coco virgen al 20% y D. melanogaster RepoGal4.*

### 5.1.2 Número y volumen de células gliales

Datos previos de este laboratorio (MEHD) indicaron que la letalidad causada por el GB en la descendencia de *D. melanogaster* sometidas a estrés lumínico se ve acelerado un 30%. Por esta razón se ha querido determinar si el estrés de dieta rica en grasa también afecta al desarrollo de este tipo de tumor.

Para ello, se ha estudiado el número de células gliales y el volumen de su membrana en cerebros de larva descendientes de parentales expuestos a HFD con inducción del GB. Estos datos experimentales se han comparado con su control positivo, es decir, aquellos con inducción del GB sin estrés y también con su control negativo, aquellos sin inducción de GB ni expuestos a estrés. El número de células gliales se ha podido estudiar gracias al inmunomarcaje con el anticuerpo anti-repo que se observa en rojo y el volumen de membrana se pudo estudiar mediante CD8-GFP que se observa en verde (Ilustración 5).

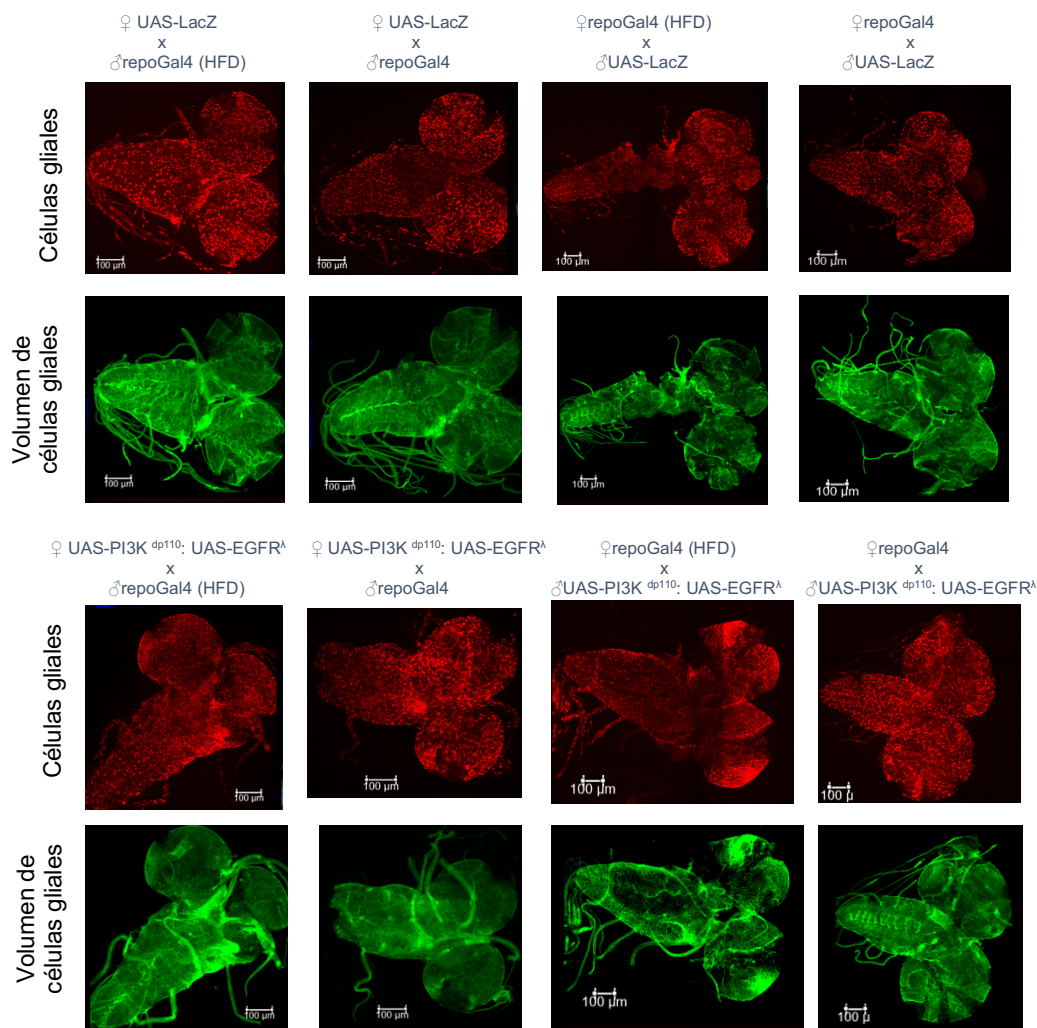


Ilustración 5 Imágenes de microscopía confocal de cerebros de larvas *D. melanogaster*. En rojo se observan los núcleos de las células gliales y en verde el volumen de membrana de estas células. Escala de 100 μm.

Mediante el programa GraphPad Prism, se ha llevado a cabo el análisis de imagen del número de células y del volumen de membrana (Ilustración 6). De esta forma, se ha podido determinar que no hay diferencias significativas en cuanto al número de células gliales en ninguno de los cruces llevados a cabo (Anexo 9.2 Tabla 7). Respecto al volumen de membrana, sólo se obtuvo una diferencia significativa en la descendencia del cruce ♀ *repoGal4* (HFD) x ♂ *UAS-PI3K<sup>dp110</sup>: UAS-EGFR<sup>λ</sup>* respecto al control positivo ♀ *UAS-PI3K<sup>dp110</sup>: UAS-EGFR<sup>λ</sup>* x ♂ *repoGal4* (Anexo 9.2 Tabla 8).

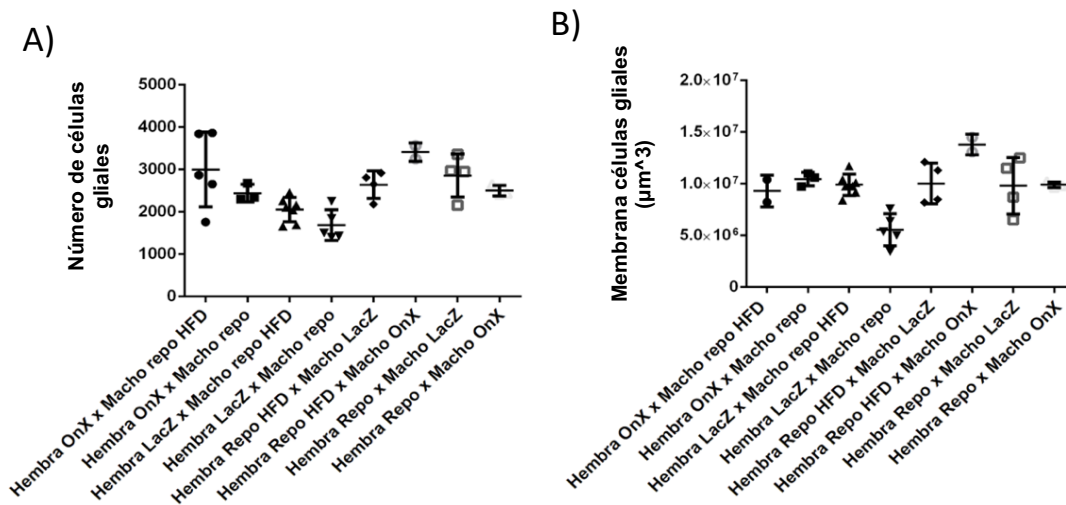


Ilustración 6 Diagramas obtenidos a partir de GraphPad (\*\*\*)  $p < 0,0001$ . (A) Número de células gliales (B) volumen de la membrana. OnX es el correspondiente a *UAS-PI3K<sup>dp110</sup>: UAS-EGFR<sup>λ</sup>*

## 5.2 Estudio de estrés lumínico en Alzheimer

El análisis de geotaxis negativa ha permitido seguir el avance de la EA para poder comprobar en primer lugar que la locomoción se ve afectada por la EA. Así como estudiar si la luz afecta a la evolución de la locomoción tanto en control como en la EA.

Con el programa GraphPad Prism se han analizado los datos de la geotaxis negativa y se han obtenido una serie de pendientes pertenecientes a la evolución de la locomoción de cada genotipo (Tabla 4).

Tabla 4 Pendiente de la línea de regresión calculada por GraphPad Prism

Pendiente evolución de locomoción (a excepción de portadores de Cyo)					
♀ <i>UAS-Aβ42</i> X ♂ <i>elavGal4</i>	♀ <i>elavGal4</i> X ♂ <i>UAS-Aβ42</i>	♀ <i>UAS-Lacz</i> (Luz) X ♂ <i>elavGal4</i>	♀ <i>UAS-Lacz</i> X ♂ <i>elavGal4</i>	♀ <i>elavGal4</i> (Luz) X ♂ <i>UAS-Lacz</i>	♀ <i>elavGal4</i> X ♂ <i>UAS-Lacz</i>
-12,14	-14,64	-0,9127	-1,887	-1,836	0,805



Como se puede observar en la Ilustración 8, el análisis de locomoción entre los genotipos permite detectar diferencias significativas entre el control negativo y el desarrollo de la EA (control positivo). De esta forma, se ha podido corroborar que el Alzheimer afecta a la locomoción ya que la diferencia de las pendientes entre control y EA es significativa (Ilustración 8). Además de ello, se ha observado vientre hinchado (Ilustración 7) en hembras lo cuál es un efecto propio de la enfermedad [35].

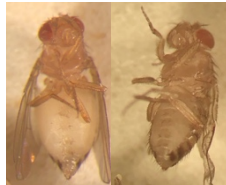


Ilustración 8 Imagen tomada en el laboratorio en el que se aprecia el vientre hinchado de A) Hembra UAS-Aβ42 elavGal4 con respecto a su control B) Hembra elavGal4/Cyo.

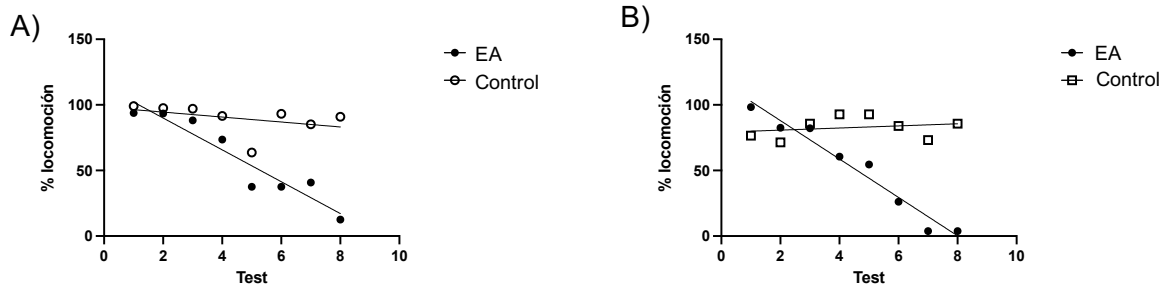


Ilustración 7 Gráfica del porcentaje de locomoción respecto al número de pruebas. A) Desarrollo de la EA corresponde al genotipo UAS-Aβ42/elavGal4 resultante del cruce ♀UAS-Aβ42 X ♂elavGal4. El control, corresponde al genotipo LacZ/elavGal4 resultante del cruce ♀ UAS-LacZ X ♂elavGal4. B) Desarrollo de la EA corresponde al genotipo elavGal4/UAS-Aβ42 resultante del cruce ♀elavGal4 X ♂UAS-Aβ42. El control corresponde al genotipo elavGal4/UAS-LacZ resultante del cruce ♀ elavGal4 X ♂UAS-LacZ.

Por otro lado, al comparar los genotipos control  $w; \frac{LacZ}{elavGal4}; \frac{+}{+}$  con y sin estrés lumínico, se ha obtenido que la luz no afecta a la locomoción ya que las pendientes (Tabla 4) obtenidas por GraphPad indican que no hay diferencias de pendiente significativas (Ilustración 9).

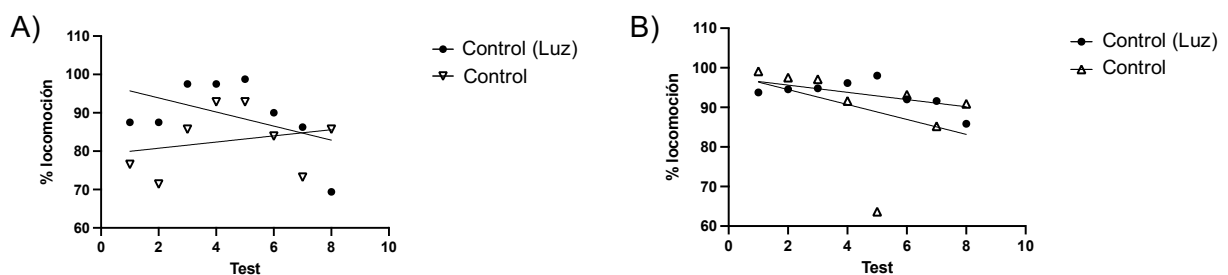


Ilustración 9 Gráfica del porcentaje de locomoción respecto al número de pruebas. A) Control (luz) corresponde al genotipo elavGal4/UAS-LacZ resultante del cruce ♀elavGal4 (luz) X ♂UAS-LacZ. El control, corresponde al genotipo elavGal4/UAS-LacZ resultante del cruce ♀elavGal4 (luz) X ♂UAS-LacZ. B) Control (luz) corresponde al genotipo UAS-LacZ/elavGal4 resultante del cruce ♀ LacZ (Luz) X ♂elavGal4. El control, corresponde al genotipo UAS-LacZ/elavGal4 resultante del cruce ♀ LacZ X ♂elavGal4.



Con respecto al efecto de la luz en el desarrollo de la EA en la descendencia, puesto que los días de vida son esenciales en la evolución de la EA, el análisis de datos se ha realizado en función de los días de vida para determinar el día en el que disminuye de forma relevante la locomoción. Se ha tenido en cuenta que los genotipos resultantes de los cruces ♀ *UAS-Aβ42* X ♂ *elavGal4* y ♀ *elavGal4* (Luz) X ♂ *UAS-Aβ42* contaban con dos días más de vida en la primera prueba, la cuál además se realizó 10 días antes del resto de cruces.

En el caso de comparar la descendencia experimental  $w; \frac{UAS-A\beta42}{elavGal4}; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}$  del cruce ♀ *UAS-Aβ42* X ♂ *elavGal4* con y sin luz (Tabla 5 e Ilustración 10). Se ha obtenido que el primer genotipo en contar con una disminución relevante proveniente de parentales sometidos a luz, con una diferencia de 3 días (Tabla5).

En cuanto a la descendencia experimental  $w; \frac{UAS-A\beta42}{elavGal4}; \frac{UAS-CD8-GFP}{+}$  del cruce ♀ *elavGal4* X ♂ *UAS-Aβ42* con y sin luz (Tabla 6 e Ilustración 11) el primer genotipo en contar con una disminución relevante proveniente de parentales sin someterse a estrés lumínico con una diferencia de 3 días.

Tabla 5 Porcentaje de locomoción en el que se compara el desarrollo de la EA y de la EA con parentales expuestos a estrés lumínico. En rojo se señala el día en el que se ve una disminución significativa de la locomoción.

Días de vida		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
♀ UAS-Aβ42(LUZ) X ♂ elavGal4	UAS-Aβ42/elavGal4; CD8-GFP			94,4%		72,2%		98,2%			85,9%		81,2%		39,06%					
♀ UAS-Aβ42 X ♂ elavGal4	UAS-Aβ42/elavGal4; CD8-GFP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
						93,75%			93,4%		88,2%				73,53%			37,5%		37,5%

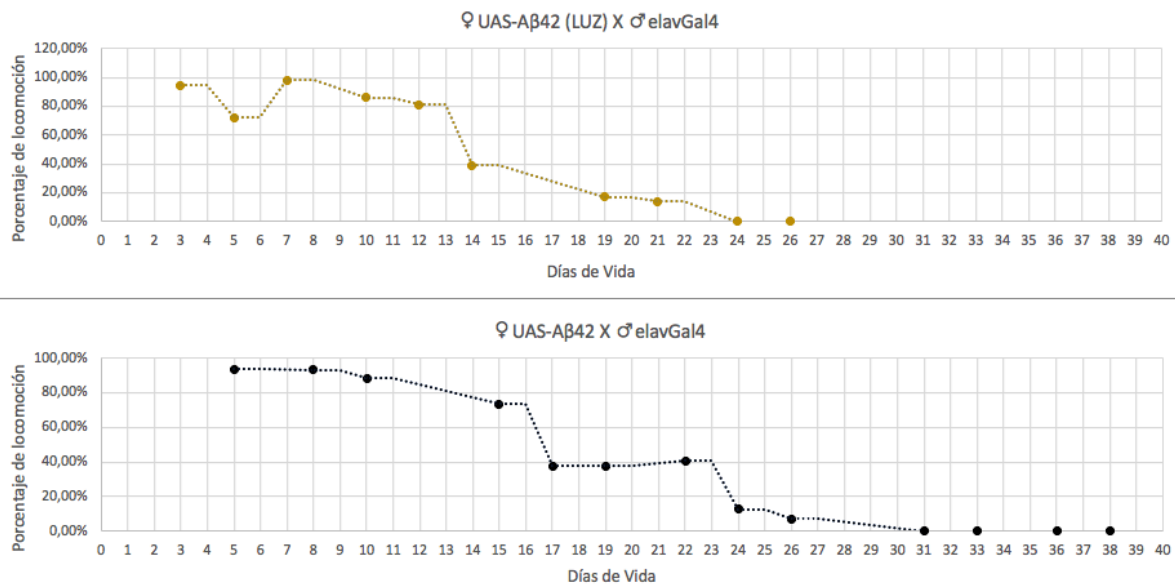


Ilustración 10 Gráfica de la evolución del porcentaje de locomoción respecto a los días de vida. Se compara el desarrollo de la EA y de la EA con parentales expuestos a estrés lumínico procedentes del cruce ♀ *UAS-Aβ42* X ♂ *elavGal4*.

Tabla 6 Porcentaje de locomoción en el que se compara el desarrollo de la EA y de la EA con parentales expuestos a estrés lumínico. En rojo se señala el día en el que se ve una disminución significativa de la locomoción.

Días de vida		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
♀ elavGal4 X ♂ UAS-Aβ42	UAS- Aβ42/elavGal4; CD8-GFP			98,3%		82,5%		82,13%			60,58%		54,54%		26,14%					
♀ elavGal4 (LUZ) X ♂ UAS-Aβ42	UAS- Aβ42/elavGal4; CD8-GFP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
						96,87%			95,83%		79,16%					79,16%		20,83%		0%

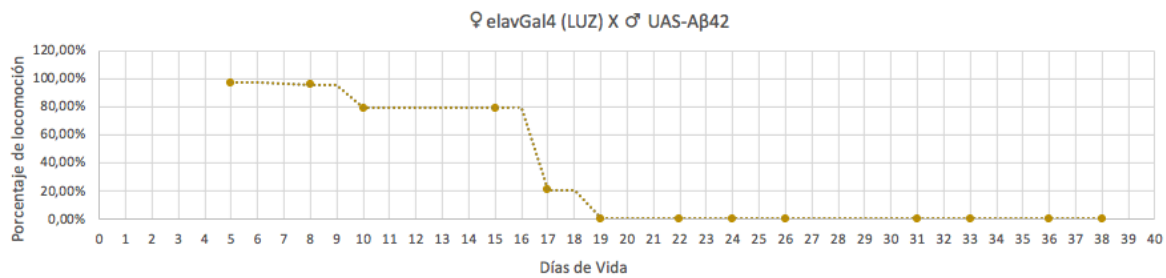
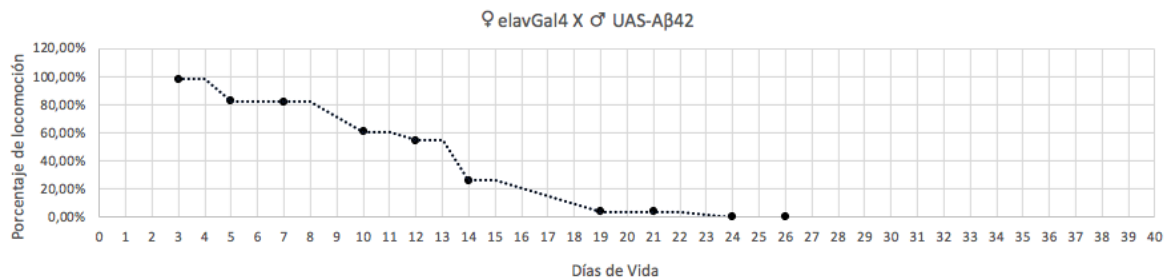


Ilustración 11 Gráfica de la evolución del porcentaje de locomoción respecto a los días de vida. Se compara el desarrollo de la EA y de la EA con parentales expuestos a estrés lumínico procedentes del cruce ♀ elavGal4 X ♂ UAS-Aβ42.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Estudio de estrés por dieta rica en grasa en glioblastoma

En el laboratorio (MEHD) tras analizar el efecto de la luz en el GB, se quiso continuar con el estudio del efecto del estrés de dieta rica en grasa en este tipo de tumor. Para ello, se ha analizado el número de células gliales y el volumen de membrana de estas células.

En cuanto a la puesta a punto del porcentaje de aceite de coco virgen. La alta mortalidad ante el 20% de concentración puede haberse debido por el bloqueo de los espiráculos que son orificios respiratorios situados en el exoesqueleto. En otros estudios se ha logrado trabajar con una dieta rica en grasa de un 20% de aceite de coco [36], esto puede deberse al modo de producción de la papilla. En este laboratorio (MEHD) se introduce la glucosa al

inicio y llega a 120°C lo que cristaliza la glucosa y puede producir una papilla de mayor viscosidad.

Para posteriores réplicas, se recomienda realizar un análisis de supervivencia, por otro lado, en la papilla agregar la glucosa tras la subida de temperatura de 120°C.

Respecto a los datos del análisis del número y volumen de membrana de células gliales, no se ha obtenido una diferencia significativa entre el desarrollo del GB (control positivo) y los controles negativos. No tener control positivo dificulta el análisis de los datos y la discusión de los mismos. La falta de control positivo se ha podido deber a una mala selección de los genotipos experimentales  $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{UAS-PI3K:UAS-EGFR}; \frac{repoGal4}{+}$  (Tabla 2) ya que a pesar de haber seleccionado aquellos con *UAS-CD8-GFP* con el microscopio de fluorescencia (4.1.4) a la hora de descartar aquellas larvas con *TM6b* puede haber habido algún error.

Sólo se ha encontrado una diferencia significativa en el volumen de membrana del genotipo experimental  $w; \frac{UAS-CD8-GFP}{UAS-PI3K:UAS-EGFR}; \frac{repoGal4}{+}$  resultante del cruce ♀ *UAS-PI3K<sup>dp110</sup>:UAS-EGFR<sup>λ</sup>* x ♂ *repoGal4* en comparación con ♀ *repoGal4* HFD x ♂ *UAS-PI3K<sup>dp110</sup>:UAS-EGFR<sup>λ</sup>* que cuenta con un mayor volumen (Anexo 9.2 Tabla 8). El número de células en esta misma comparación, aunque según el análisis empleado no es significativo, sí que es en el que se alcanza mayor diferencia (Anexo 9.2 Tabla 7). Esto pondría en duda las conclusiones a las que se llegó en el laboratorio MEHD de que la dieta rica en grasa tiene un mayor impacto en la viabilidad de F<sub>1</sub> por vía paterna. Sin embargo, para validar el experimento debería realizarse de nuevo disponiéndose de un control positivo y un tamaño de muestra mayor (n).

En este proyecto de fin de grado es la primera vez que se estudia el efecto de la dieta rica en grasa en el desarrollo del GB en la descendencia, sin embargo, los resultados obtenidos no se pueden contrastar con otros estudios, ya que estos no apoyan los resultados obtenidos. Esto se debe a que en los padres expuestos a HFD disminuye la expresión de miARN let-7 en la descendencia F1 y F2 [54]. Por otro lado, sabemos que miARN let-7 ejerce un efecto antitumoral y su expresión reducida aumenta la agresividad del GB [53, 55]. Por esta razón, se podría plantear la hipótesis de que la exposición paterna a HFD disminuya la expresión de miARN let-7, se transmita a través de las células espermáticas alterando los tejidos

metabólicos de la descendencia. De esta manera, la expresión disminuida en la descendencia de miARN let-7 favorecería la proliferación del GB.

Para posteriores estudios, tras el análisis del número y volumen de células gliales, se plantea llevar a cabo un estudio de geotaxis negativa para estudiar la sinapsis ya que la variante PI3KCA (también conocida como proteína p110) se manifiesta con una remodelación de la sinapsis [37]. De esta forma obtener información no sólo a nivel celular sino también de la respuesta fisiológica. Debido a la letalidad del tumor, este proceso se llevaría a cabo mediante el sistema de represión *Gal80TS* (*temperatura-sensitive*) que inactiva el sistema Gal4/UAS cuando *D. melanogaster* se mantiene a 17°C. De esta forma, se mantendrían a 17°C hasta que llegaran a estado adulto momento en el que se incuban a 29°C para inactivar el sistema Gal80TS y activar así el sistema Gal4/UAS [56].

Sería recomendable, exponer al estrés no sólo a *D. melanogaster* portadoras de *repoGal4*, sino también de aquellas portadoras de *UAS-PI3K<sup>dp110</sup>:UAS-EGFR<sup>Δ</sup>* y *UAS-LacZ*. De esta forma, poder contemplar más posibilidades y estudiar el origen de las marcas epigenéticas. Por otra parte, también se propone estudiar la F<sub>2</sub> para poder diferenciar la herencia de las marcas epigenéticas respecto el efecto materno, ya que las hembras contienen todos los huevos en su interior y al ser estresadas puede producir modificaciones en los huevos sin ser heredados [38, 39, 53]. También se contempla el empleo de una dieta rica en azúcares para el estudio en la descendencia ya que se ha visto que el azúcar paterno controla la adiposidad de la descendencia en *D. melanogaster* [40] así como afecta a los niveles de triglicéridos, la fecundidad, la duración de la vida [41] y la supervivencia de algunos tumores como el GB [42].

## 6.2 Estudio de estrés lumínico en Alzheimer

Al igual que en el laboratorio (MEHD) se estudió el efecto de la luz en el GB, se propuso estudiar el efecto de la luz en la EA. Para ello, se llevó a cabo el análisis de Geotaxis Negativa en el que proyectos previos estudian el descenso de la locomoción en *D. melanogaster* mutados con *UAS-Aβ42* [43, 44].

Los resultados de los controles negativos no han mostrado un descenso de la locomoción, de esta manera contamos con un buen control para poder compararlo con la evolución de la EA. Respecto a los controles positivos se ha visto un descenso significativo de la locomoción, por lo que podemos corroborar la pérdida de locomoción de la EA y asegurar un correcto desarrollo de esta enfermedad.

En cuanto al efecto de la luz en el desarrollo de la EA en la descendencia, los resultados indican que los genotipos procedentes del cruce ♀ *UAS-Aβ42* (Luz) X ♂ *elavGal4*, el estrés lumínico acelera el descenso de la locomoción 3 días (Tabla 5 e Ilustración 10). En cuanto al cruce ♀ *elavGal4* (Luz) X ♂ *UAS-Aβ42*, el estrés lumínico ralentiza el descenso de la locomoción 3 días (Tabla 6 e Ilustración 11). Estas diferencias son resultado del estrés lumínico ya que al comparar los controles positivos de ambos cruces (Tabla 4), se obtiene una mayor pendiente (-14,64) en el cruce ♀ *elavGal4* X ♂ *UAS-Aβ42*, es decir un descenso de la locomoción más rápido, mientras que en el cruce ♀ *UAS-Aβ42* X ♂ *elavGal4* el descenso de la locomoción se ve ralentizado ya que tiene una pendiente de -12,14.

Se podría suponer de esta información que, el estrés lumínico afecta a las hembras portadoras de *UAS-Aβ42*.

Diferentes hipótesis se pueden plantear para explicar estos resultados. En primer lugar, que la luz de lugar a un cambio de micro RNA que pueda ser heredado y esto provoque una desregulación de la histona acetiltransferasa (HAT) TIP60 que se encarga de acetilar residuos de lisina en las histonas H2A, H3 y H4 [45,24]. Esta desregulación, puede dar un aumento de la acetilación de la histona H3K27 (H3K27ac) en los que se ven alterados varios genes vecinos en los que se incluye *APP* que codifica para la (APP) [46] y de la acetilación de la histona H3K9 (H3K9ac) promoviendo la neurodegeneración por *Aβ42* [47]. De esta forma, se ampliaría la neurodegeneración de la EA. También se podría contemplar como causa el estrés oxidativo ROS que se produce ante el estrés lumínico [4] y podría afectar a los huevos. Esto, sumado al ROS que produce la EA y tiene un importante papel en su patología [24], supondría un cambio en la evolución de la EA.

Pero esto no explicaría por qué no hay una aceleración de la neurodegeneración en la descendencia del cruce ♀ *elavGal4*(Luz) X ♂ *UAS-Aβ42* ya que en los dos cruces se heredan las mismas modificaciones.

A pesar de ello, sólo es el comienzo y no se puede llegar a ninguna conclusión. Para posteriores estudios se plantea llevar a cabo replicaciones al mismo tiempo con todos los genotipos y análisis de supervivencia. Tras ello, se repetirían los cruces y en el día previsto de disminución de la locomoción se realizarían disecciones en libro de *D. melanogaster* para estudiar la sinapsis con microscopía confocal. Finalmente, un análisis de qRT-PCR para comprobar los cambios en la expresión de ARN y análisis de Secuenciación de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP-sequencing) para detectar interacciones ADN-proteína como la acetilación de histonas ya que es la marca epigenética mayormente implicada en la EA [24, 46].

Por otro lado, la forma tradicional de geotaxis negativa que se ha empleado en este estudio es tedioso, laborioso y hay mucha variabilidad entre las diferentes pruebas. Por esta razón, se propone el empleo del análisis de geotaxis negativa itinerativa rápida (RING) un método para el estudio a gran escala en el que se fotografía simultáneamente la escalada de múltiples grupos de moscas cuando se golpean manualmente en tubos de ensayo [48]. También existe una forma automatizada (aRING) que emplea un motor eléctrico para golpear los tubos y un programa para analizar la altura de escalada [49].

## 7. CONCLUSIONES

- El estrés lumínico no afecta a la locomoción en individuos sanos.
- La Enfermedad del Alzheimer provoca un descenso de la locomoción y se sugiere que este descenso depende del cruce realizado.
- El estrés lumínico afecta a las hembras portadoras de  $A\beta$  42 acelerando la evolución de la Enfermedad del Alzheimer.
- El porcentaje de aceite de coco virgen idóneo es del 10% para papilla en el que se vierte glucosa antes del aumento de temperatura hasta 120°C.
- En cuanto al efecto de la dieta rica en grasa en el desarrollo del GB en la descendencia no se ha podido dilucidar ninguna suposición, sin embargo, se han planteado diversas soluciones, métodos experimentales e hipótesis para posteriores estudios.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cormier, R. J., Strang, R., Menail, H., Touaibia, M., & Pichaud, N. (2021). Systemic and mitochondrial effects of metabolic inflexibility induced by high fat diet in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 133, 103556.
- [2] Bošković, A., & Rando, O. J. (2018). Transgenerational epigenetic inheritance. *Annual review of genetics*, 52, 21-41.
- [3] Atlasi, Y., & Stunnenberg, H. G. (2017). The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*, 18(11), 643-658.
- [4] Krishnan, N., Kretschmar, D., Rakshit, K., Chow, E., & Giebultowicz, J. M. (2009). The circadian clock gene period extends healthspan in aging *Drosophila melanogaster*. *Aging*, 1(11), 937-948. <https://doi.org/10.18632/aging.100103>
- [5] Fujioka, A., Takashima, N., & Shigeyoshi, Y. (2006). Circadian rhythm generation in a glioma cell line. *Biochemical and biophysical research communications*, 346(1), 169-174.
- [6] Savvidis, C., & Koutsilieris, M. (2012). Circadian rhythm disruption in cancer biology. *Molecular medicine*, 18(9), 1249-1260.
- [7] Gomez, G. G., Wykosky, J., Zanca, C., Furnari, F. B., & Cavenee, W. K. (2013). Therapeutic resistance in cancer: microRNA regulation of EGFR signaling networks. *Cancer biology & medicine*, 10(4), 192.
- [8] Melnik, B. C. (2015). MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma?. *Journal of translational medicine*, 13(1), 1-16.
- [9] Miguel, V., Cui, J. Y., Daimiel, L., Espinosa-Diez, C., Fernández-Hernando, C., Kavanagh, T. J., & Lamas, S. (2018). The role of MicroRNAs in environmental risk factors, noise-induced hearing loss, and mental stress. *Antioxidants & redox signaling*, 28(9), 773-796.
- [10] Xiao, J. (Ed.). (2018). Circular RNAs: biogenesis and functions (Vol. 1087). Springer.
- [11] Matsuyama, H., & Suzuki, H. I. (2019). Systems and synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 132.

- [12] Cormier, R. J., Strang, R., Menail, H., Touaibia, M., & Pichaud, N. (2021). Systemic and mitochondrial effects of metabolic inflexibility induced by high fat diet in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 133, 103556.
- [13] Silver, D. J., Roversi, G. A., Bithi, N., Wang, S. Z., Troike, K. M., Neumann, C. K., ... & Lathia, J. D. (2021). Severe consequences of a high-lipid diet include hydrogen sulfide dysfunction and enhanced aggression in glioblastoma. *The Journal of clinical investigation*, 131(17).
- [14] Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F. X., Barroso, E., Pallas, M., ... & Camins, A. (2015). High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1852(9), 1687-1699.
- [15] Liao, S., Amcoff, M., & Nässel, D. R. (2021). Impact of high-fat diet on lifespan, metabolism, fecundity and behavioral senescence in *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 133, 103495.
- [16] Chen, A. S., & Read, R. D. (2019). *Drosophila melanogaster* as a model system for human glioblastomas. *The Drosophila Model in Cancer*, 207-224.
- [17] PDQ® sobre el tratamiento para adultos. PDQ Tratamiento de los tumores del sistema nervioso central en adultos. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Actualización: <15/04/2021>. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cerebro/pro/tratamiento-cerebro-adultos-pdq>. Fecha de acceso: <12/04/2022>.
- [18] Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S. M., ... & Reifenberger, G. (2015). Glioma. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-18.
- [19] Du, Z., & Lovly, C. M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular cancer*, 17(1), 1-13.
- [20] Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers*, 9(5), 52.
- [21] Jiang, W., & Ji, M. (2019, December). Receptor tyrosine kinases in PI3K signaling: The therapeutic targets in cancer. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 59, pp. 3-22). Academic Press.



- [20] Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers*, 9(5), 52.
- [22] Casas-Tinto, S., Zhang, Y., Sanchez-Garcia, J., Gomez-Velazquez, M., Rincon-Limas, D. E., & Fernandez-Funez, P. (2011). The ER stress factor XBP1s prevents amyloid- $\beta$  neurotoxicity. *Human molecular genetics*, 20(11), 2144-2160.
- [23] Deolankar, S. C., Najar, M. A., Raghu, S. V., & Prasad, T. S. K. (2022). A $\beta$ 42 Expressing *Drosophila melanogaster* Model for Alzheimer's Disease: Quantitative Proteomics Identifies Altered Protein Dynamics of Relevance to Neurodegeneration. *Omics: a journal of integrative biology*.
- [24] Jeon, Y., Lee, J. H., Choi, B., Won, S. Y., & Cho, K. S. (2020). Genetic dissection of Alzheimer's disease using *Drosophila* models. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 884.
- [25] Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M. A., Goldstein, L. E., Duong, S., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PloS one*, 5(3), e9505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009505>
- [26] Tabaton, M., Zhu, X., Perry, G., Smith, M. A., & Giliberto, L. (2010). Signaling effect of amyloid- $\beta$  42 on the processing of A $\beta$  PP. *Experimental neurology*, 221(1), 18-25.
- [27] Anatomía, E., Sarasa Barrio, J. M., & Pesini Ruíz, P. Método de cuantificación de Ab40 y Ab42 en el plasma y aplicación de los índices Ab42/40 como posibles biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer.
- [28] Jones, W. D. (2009). The expanding reach of the GAL4/UAS system into the behavioral neurobiology of *Drosophila*. *BMB reports*, 42(11), 705-712.
- [29] Hentges, K. E., & Justice, M. J. (2004). Checks and balancers: balancer chromosomes to facilitate genome annotation. *TRENDS in Genetics*, 20(6), 252-259.
- [30] Miller, D. E., Cook, K. R., Hemenway, E. A., Fang, V., Miller, A. L., Hales, K. G., & Hawley, R. S. (2018). The molecular and genetic characterization of second chromosome balancers in *Drosophila melanogaster*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(4), 1161-1171.

- [31] Zou, K., Gong, J. S., Yanagisawa, K., & Michikawa, M. (2002). A novel function of monomeric amyloid  $\beta$ -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *Journal of Neuroscience*, 22(12), 4833-4841.
- [32] Rhodenizer, D., Martin, I., Bhandari, P., Pletcher, S. D., & Grotewiel, M. (2008). Genetic and environmental factors impact age-related impairment of negative geotaxis in *Drosophila* by altering age-dependent climbing speed. *Experimental gerontology*, 43(8), 739-748.
- [33] 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.
- [34] Portela, M., Mitchell, T., & Casas-Tintó, S. (2020). Cell-to-cell communication mediates glioblastoma progression in *Drosophila*. *Biology open*, 9(9), bio053405.
- [35] Arnés, M., Casas-Tintó, S., Malmendal, A., & Ferrús, A. (2017). Amyloid  $\beta$ 42 peptide is toxic to non-neural cells in *Drosophila* yielding a characteristic metabolite profile and the effect can be suppressed by PI3K. *Biology open*, 6(11), 1664-1671.
- [36] Cormier, R. P., Champigny, C. M., Simard, C. J., St-Coeur, P. D., & Pichaud, N. (2019). Dynamic mitochondrial responses to a high-fat diet in *Drosophila melanogaster*. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- [37] Yu, K., Lin, C. C. J., Hatcher, A., Lozzi, B., Kong, K., Huang-Hobbs, E., ... & Deneen, B. (2020). PIK3CA variants selectively initiate brain hyperactivity during gliomagenesis. *Nature*, 578(7793), 166-171.
- [38] Dew-Budd, K., Jarnigan, J., & Reed, L. K. (2016). Genetic and sex-specific transgenerational effects of a high fat diet in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 11(8), e0160857.
- [39] Palu, R. A., Praggastis, S. A., & Thummel, C. S. (2017). Parental obesity leads to metabolic changes in the F2 generation in *Drosophila*. *Molecular metabolism*, 6(7), 631-639.
- [40] Öst, A., Lempradl, A., Casas, E., Weigert, M., Tiko, T., Deniz, M., ... & Pospisilik, J. A. (2014). Paternal diet defines offspring chromatin state and intergenerational obesity. *Cell*, 159(6), 1352-1364.
- [41] Camilleri, T. L., Piper, M. D., Robker, R. L., & Dowling, D. K. (2022). Maternal and paternal sugar consumption interact to modify offspring life history and physiology. *Functional Ecology*.

- [42] Montemurro, N., Perrini, P., & Rapone, B. (2020). Clinical risk and overall survival in patients with diabetes mellitus, hyperglycemia and glioblastoma multiforme. A review of the current literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(22), 8501.
- [43] Jahn, T. R., Kohlhoff, K. J., Scott, M., Tartaglia, G. G., Lomas, D. A., Dobson, C. M., ... & Crowther, D. C. (2011). Detection of early locomotor abnormalities in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience methods*, 197(1), 186-189.
- [44] Rogers, I., Kerr, F., Martinez, P., Hardy, J., Lovestone, S., & Partridge, L. (2012). Ageing increases vulnerability to  $A\beta$  42 toxicity in *Drosophila*. *PLoS one*, 7(7), e40569.
- [45] Li, Z., & Rasmussen, L. J. (2020). TIP60 in aging and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews*, 64, 101195.
- [46] Marzi, S. J., Leung, S. K., Ribarska, T., Hannon, E., Smith, A. R., Pishva, E., ... & Mill, J. (2018). A histone acetylome-wide association study of Alzheimer's disease identifies disease-associated H3K27ac differences in the entorhinal cortex. *Nature neuroscience*, 21(11), 1618-1627.
- [47] Nativio, R., Lan, Y., Donahue, G., Sidoli, S., Berson, A., Srinivasan, A. R., ... & Berger, S. L. (2020). An integrated multi-omics approach identifies epigenetic alterations associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 52(10), 1024-1035.
- [48] Gargano, J. W., Martin, I., Bhandari, P., & Grotewiel, M. S. (2005). Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Experimental gerontology*, 40(5), 386-395.
- [49] Liu, H., Han, M., Li, Q., Zhang, X., Wang, W. A., & Huang, F. D. (2015). Automated rapid iterative negative geotaxis assay and its use in a genetic screen for modifiers of  $A\beta$  42-induced locomotor decline in *Drosophila*. *Neuroscience bulletin*, 31(5), 541-549.
- [51] Ejeskär, K., Vikes, O., Kuchipudi, A., Wettergren, Y., Uv, A., & Rotter Sopasakis, V. (2015). The Unique Non-Catalytic C-Terminus of P37delta-PI3K Adds Proliferative Properties In Vitro and In Vivo. *PLoS one*, 10(5), e0127497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127497>

- [52] 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.
- [53] Lee, S. T., Chu, K., Oh, H. J., Im, W. S., Lim, J. Y., Kim, S. K., ... & Roh, J. K. (2011). Let-7 microRNA inhibits the proliferation of human glioblastoma cells. *Journal of neuro-oncology*, 102(1), 19-24.
- [54] de Castro Barbosa, T., Ingerslev, L. R., Alm, P. S., Versteyhe, S., Massart, J., Rasmussen, M., ... & Barrès, R. (2016). High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Molecular metabolism*, 5(3), 184-197.
- [55] Reséndiz-Castillo, L. J., Minjarez, B., Reza-Zaldívar, E. E., Hernández-Sapiéns, M. A., Gutiérrez-Mercado, Y. K., & Canales-Aguirre, A. A. (2021). The effects of altered neurogenic microRNA levels and their involvement in the aggressiveness of periventricular glioblastoma. *Neurología* (English Edition).
- [56] Arnés, M., Romero, N., Casas-Tintó, S., Acebes, Á., & Ferrús, A. (2020). PI3K activation prevents A $\beta$  42-induced synapse loss and favors insoluble amyloid deposit formation. *Molecular biology of the cell*, 31(4), 244-260.

## 9. Anexos

### 9.1 Contribución al Medio Ambiente

El empleo de *D. melanogaster* en vez de otras especies como ratones, reduce considerablemente la cantidad de residuos que se producen en el laboratorio. Por otra parte, el estudio de la herencia epigenética es un factor importante para las especies que se enfrentan a cambios ambientales rápidos como consecuencia al cambio climático.

### 9.2 Número y volumen de células gliales Graphpad Prism

Tabla 7 Número de células gliales GraphPad Prism

Nº de células			
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra LacZ x Macho	5,6	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra LacZ x Macho HFD	13,6	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra OnX x Macho repo	18,4	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra Repo HFD x Macho LacZ	2,85	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra Repo HFD x Macho OnX	-6,4	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra Repo x Macho LacZ	-0,15	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra Repo x Macho OnX	5,267	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra LacZ x Macho HFD	8	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra OnX x Macho repo	12,8	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra Repo HFD x Macho LacZ	-2,75	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra Repo HFD x Macho OnX	-12	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra Repo x Macho LacZ	-5,75	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra Repo x Macho OnX	-0,3333	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo HFD vs. Hembra OnX x Macho repo	4,8	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo HFD vs. Hembra Repo HFD x Macho LacZ	-10,75	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo HFD vs. Hembra Repo HFD x Macho OnX	-20	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo HFD vs. Hembra Repo x Macho LacZ	-13,75	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo HFD vs. Hembra Repo x Macho OnX	-8,333	No	ns
Hembra OnX x Macho repo vs. Hembra Repo HFD x Macho LacZ	-15,55	No	ns
Hembra OnX x Macho repo vs. Hembra Repo HFD x Macho OnX	-24,8	No	ns
Hembra OnX x Macho repo vs. Hembra Repo x Macho LacZ	-18,55	No	ns
Hembra OnX x Macho repo vs. Hembra Repo x Macho OnX	-13,13	No	ns
Hembra Repo HFD x Macho LacZ vs. Hembra Repo HFD x Macho OnX	-9,25	No	ns
Hembra Repo HFD x Macho LacZ vs. Hembra Repo x Macho LacZ	-3	No	ns
Hembra Repo HFD x Macho LacZ vs. Hembra Repo x Macho OnX	2,417	No	ns
Hembra Repo HFD x Macho OnX vs. Hembra Repo x Macho LacZ	6,25	No	ns

Hembra Repo HFD x Macho OnX vs. Hembra Repo x Macho OnX	11,67	No	ns
Hembra Repo x Macho LacZ vs. Hembra Repo x Macho OnX	5,417	No	ns

Tabla 8 Volumen de membrana de las células gliales GraphPadPrism

Volumen			
Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra LacZ x Macho	-5,417	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra LacZ x Macho HFD	-2,393	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra OnX x Macho repo	11,05	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra Repo HFD x Macho LacZ	-2,75	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra Repo HFD x Macho OnX	-15,25	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra Repo x Macho LacZ	-3	No	ns
Hembra OnX x Macho repo HFD vs. Hembra Repo x Macho OnX	-2,083	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra LacZ x Macho HFD	3,024	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra OnX x Macho repo	16,47	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra Repo HFD x Macho LacZ	2,667	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra Repo HFD x Macho OnX	-9,833	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra Repo x Macho LacZ	2,417	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo vs. Hembra Repo x Macho OnX	3,333	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo HFD vs. Hembra OnX x Macho repo	13,44	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo HFD vs. Hembra Repo HFD x Macho LacZ	-0,3571	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo HFD vs. Hembra Repo HFD x Macho OnX	-12,86	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo HFD vs. Hembra Repo x Macho LacZ	-0,6071	No	ns
Hembra LacZ x Macho repo HFD vs. Hembra Repo x Macho OnX	0,3095	No	ns
Hembra OnX x Macho repo vs. Hembra Repo HFD x Macho LacZ	-13,8	No	ns
Hembra OnX x Macho repo vs. Hembra Repo HFD x Macho OnX	-26,3	Yes	*
Hembra OnX x Macho repo vs. Hembra Repo x Macho LacZ	-14,05	No	ns
Hembra OnX x Macho repo vs. Hembra Repo x Macho OnX	-13,13	No	ns
Hembra Repo HFD x Macho LacZ vs. Hembra Repo HFD x Macho OnX	-12,5	No	ns
Hembra Repo HFD x Macho LacZ vs. Hembra Repo x Macho LacZ	-0,25	No	ns
Hembra Repo HFD x Macho LacZ vs. Hembra Repo x Macho OnX	0,6667	No	ns
Hembra Repo HFD x Macho OnX vs. Hembra Repo x Macho LacZ	12,25	No	ns
Hembra Repo HFD x Macho OnX vs. Hembra Repo x Macho OnX	13,17	No	ns
Hembra Repo x Macho LacZ vs. Hembra Repo x Macho OnX	0,9167	No	ns

9.3 Gráficas de líneas de regresión del análisis GN en Alzheimer Graphpad Prism

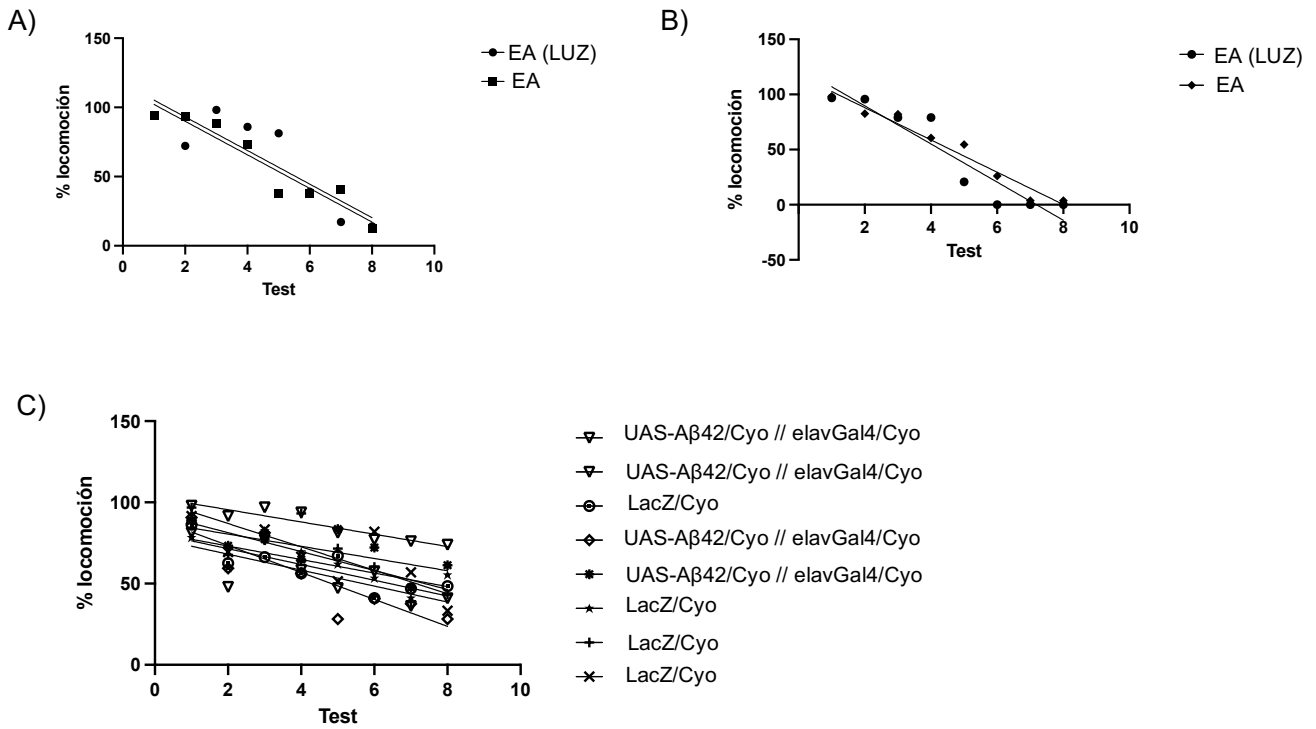


Ilustración 12 A) Diagrama de evolución de la EA respecto a EA procedente de parentales expuestos a estrés lumínico del cruce ♀ UAS-Aβ42 X ♂ elavGal4.

B) Diagramas de evolución de la EA respecto a EA procedente de parentales expuestos a estrés lumínico del cruce ♀elavGal4 X ♂UAS-Aβ42.

C) Diagrama de los controles con el balanceador Cyo en el que vemos un comportamiento similar.