

# Armado y calibración de un setup optogenético para estudiar ritmos circadianos en *Drosophila melanogaster*

Trabajo final para optar al título de Licenciado en Ciencias Biológicas

Alumno: Gustavo Ezequiel Perez.

Directora: Dra. Lorena Franco.

Co-director: Dr. Sebastian Risau.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neurogenética, Departamento de Física Medica, Centro Atómico Bariloche, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina



Universidad Nacional del Comahue  
Centro Regional Universitario Bariloche

Marzo 2022

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>2</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
1.1. Los ritmos circadianos . . . . .	3
1.2. El reloj molecular . . . . .	3
1.3. El circuito circadiano en <i>D. melanogaster</i> . . . . .	4
1.3.1. El marcapasos central . . . . .	4
1.3.2. El rol de las neuronas DN1ps . . . . .	7
1.4. Efectos post-cópula . . . . .	8
1.5. Modulación aguda neuronal: optogenética . . . . .	9
<b>2. Objetivos del trabajo</b>	<b>10</b>
<b>3. Metodología</b>	<b>11</b>
3.1. El sistema UAS-GAL4 . . . . .	11
3.2. Mantenimiento de las líneas empleadas . . . . .	11
3.3. Nomenclatura de <i>D. melanogaster</i> . . . . .	12
3.4. Manipulación optogenética de la actividad neuronal . . . . .	12
3.4.1. Inducción con retinal . . . . .	13
3.5. Monitoreo de la actividad locomotora . . . . .	13
3.6. Análisis de datos . . . . .	14
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>17</b>
4.1. Efectos de la estimulación optogenética sobre genotipos controles . . . . .	17
4.2. Activación de las neuronas DN1ps . . . . .	21
4.2.1. Activación de las DN1ps restringida al periodo de luz . . . . .	25
4.2.2. Activación de las DN1ps en hembras . . . . .	29
4.3. Activación de las neuronas PDF . . . . .	33
4.3.1. Activación de las neuronas PDF en machos y hembras vírgenes . . . . .	33
4.3.2. Activación de las neuronas PDF en hembras apareadas . . . . .	38
<b>5. Conclusiones</b>	<b>40</b>
5.1. Activación de las neuronas DN1p . . . . .	40
5.2. Activación de las neuronas PDF . . . . .	41
5.3. Alcances y limitaciones de la estimulación optogenética con CsChrimson . . . . .	41
<b>Agradecimientos</b>	<b>42</b>

## Resumen

Los ritmos circadianos son observados en todos los dominios de la vida. Particularmente, *Drosophila melanogaster* posee un ritmo circadiano locomotor que es controlado por grupos de neuronas en el cerebro llamadas neuronas relojeras. En este trabajo, se evaluó la utilidad de la activación optogenética de neuronas relojeras mediante la expresión de un canal iónico activable con luz roja, *CsChrimson*, utilizando un dispositivo fotónico. Se activaron en machos un grupo de neuronas glutamatérgicas (DN1p) durante la segunda parte del día y toda la noche. Se observó un fuerte aumento locomotor en todas las moscas, aunque menos pronunciado en las moscas que expresaban *CsChrimson*. La estimulación solo por la tarde, reduce el aumento locomotor en los controles y debilmente aumenta la cantidad de sueño en moscas que expresan *CsChrimson*. Luego, se indujo la activación matutina de las mismas neuronas en hembras apareadas y vírgenes. Hubo un aumento de sueño diurno en todas las moscas que expresaban *CsChrimson* y ningún efecto en los controles. Se estimuló también la activación matutina y vespertina de neuronas PDF. La respuesta a la estimulación vespertina resultó igual para ambos sexos y para todas las moscas, observandose una mayor amplitud del pico E. Interesantemente, la estimulación matutina generó respuestas sexo dependientes en las moscas que expresaban el canal *CsChrimson*, reduciendo la cantidad de sueño diurno en machos y aumentándola en hembras. Por último, se estimuló a las mismas neuronas durante la tarde en hembras apareadas para recuperar su actividad anticipatoria de la mañana. No fue posible recuperar dicho comportamiento, y también se observó un aumento locomotor en todas las moscas durante la estimulación. Debido a que la luz es un importante factor en los comportamientos circadianos, la manipulación optogenética de neuronas relojeras en *Drosophila melanogaster* resulta un desafío para la neurociencia como se muestra en este trabajo.

Circadian rhythms are observed in all domains of life. In particular, *Drosophila melanogaster* has a locomotor circadian rhythm that is controlled by groups of neurons in the brain called clock neurons. In this work, the usefulness of optogenetic activation of clock neurons by expression of a red light-triggered ion channel, *CsChrimson*, was evaluated using a photonic device. A group of glutamatergic neurons (DN1p) were activated in males during the second part of the day and all night. A strong locomotor enhancement was observed in all flies, although less pronounced in flies expressing *CsChrimson*. Stimulation only in the afternoon reduces locomotor gain in controls and weakly increases the amount of sleep in flies expressing *CsChrimson*. Then, morning activation of the same neurons was induced in mated females and virgins. There was an increase in daytime sleep in all flies expressing *CsChrimson* and no effect in controls. Morning and evening activation of another group, PDF neurons, was also stimulated. The response to evening stimulation was the same for both sexes and for all flies, with a greater amplitude of the E peak being observed. Interestingly, morning stimulation generated sex-dependent responses in the *CsChrimson*-expressing flies, reducing the amount of daytime sleep in males and increasing it in females. Finally, the same neurons were stimulated during the afternoon in mated females to recover their morning anticipatory activity. It was not possible to recover it, and a locomotor increase was also observed in all flies during stimulation. Because light is an important factor in circadian behaviors, the optogenetic manipulation of clock neurons in *Drosophila melanogaster* is a challenge for neuroscience as shown in this work.

Palabras clave: activación neuronal, neuronas relojeras, optogenética, reloj molecular, respuesta *startle*.

Key words: clock neurons, molecular clock, neuronal activation, optogenetic, *startle* response.

## 1. Introducción

### 1.1. Los ritmos circadianos

Los ritmos circadianos agrupan todos los comportamientos y fenómenos cíclicos observados a nivel comportamental, fisiológico celular, metabólico y molecular que tienen una periodicidad aproximada de 24 hs. Estos fenómenos y comportamientos, son ubicuos en toda la naturaleza y resultan vitalmente importantes para la supervivencia, desarrollo y reproducción de los seres vivos. Para que un ritmo observado se considere circadiano, debe cumplir con las siguientes características: (1) mostrar una oscilación diaria con un periodo aproximado de 24 hs cuando es expuesto a cualquier clave ambiental constante, lo cual es denominado “condición de libre curso”; y (2) debe ser capaz de entrenarse y ajustarse a los periodos de dichas claves, siendo la más común los ciclos de luz-oscuridad, pero también temperatura (Barrett, Takahashi, 1995), alimentación (Franco et al., 2018) y hasta claves sociales (Aschoff et al., 1971). Las claves ambientales entrenadoras constituyen cambios periódicos en la naturaleza de periodo de exactamente 24hs y son denominadas “Zeitgeber” (literalmente, “dador de tiempo” en alemán) (Lowrey, Takahashi, 2004). (3) Debe ser compensado por temperatura, es decir, la temperatura ambiental no influye en la periodicidad del ritmo.

La maquinaria molecular que controla los ritmos circadianos es endógena a cada individuo y se denomina reloj circadiano u oscilador circadiano. Esta consiste en la expresión oscilatoria estacionaria a lo largo del tiempo de unos pocos genes, lograda a través de un sistema de retroalimentación negativa donde los productos proteicos de dichos genes funcionan como represores de su propia expresión. Una compleja red de regulación post-transcripcional que involucra tasas de fosforilación de varias proteínas, cumple además un papel importante en la regulación del periodo y oscilación del reloj. Esta maquinaria, varía en nivel de complejidad regulatoria a través de las especies, pero en todas ellas produce el *output* fisiológico y comportamental necesario para cada momento del día (Ko, Takahashi, 2006).

Los ritmos circadianos son observados en todos los dominios de la vida. Hasta 1985, se creía que era una característica presente solo en eucariotas, pero el descubrimiento de procesos metabólicos circadianos en cianobacterias planteó que la antigüedad de este carácter llegaría hasta el comienzo de la vida misma (Mitsui et al., 1986). Estudios posteriores también han observado ritmos circadianos en *Escherichia coli*, arqueas halofíticas y bacterias púrpuras, además de estudios moleculares que trazaron la homología de los componentes del oscilador circadiano de cianobacterias a muchas otras bacterias no fotosintéticas y arqueas (Harmer et al., 2001; Wen et al., 2015; Bhadra et al., 2017).

### 1.2. El reloj molecular

La facilidad de realizar cribados genéticos en *Drosophila*, combinado con el análisis automatizado de la actividad locomotora, ha permitido identificar los genes responsables de generar las oscilaciones circadianas a nivel molecular. Hoy en día se entiende que el ritmo del reloj circadiano depende de la regulación transcripcional y postraduccional de la expresión de genes canónicos del reloj en un ciclo que dura aproximadamente 24 horas. La regulación transcripcional se lleva a cabo por medio de dos ciclos transcripcionales de retroalimentación negativa que operan en fases opuestas, mientras que modificaciones postraducionales realizan el control fino de la estabilidad y localización subcelular de las proteínas canónicas del reloj (Özkaya, Rosato, 2012). Los componentes principales del reloj molecular son 6 factores de transcripción (TF por sus siglas en inglés) codificados por los siguientes genes: *Period* (*per*), *Timeless* (*tim*), *Clock* (*clk*), *Cycle* (*cyc*), *Par domain protein 1* ( $\epsilon$ ) (*Pdp1 $\epsilon$* ) y *transcription repressor Vrille* (*Vri*) (Ahmad et al., 2021). El primer ciclo lo conforman el dímero CLK-CYC, el cual promueve la expresión de *Vri* y *Pdp1 $\epsilon$* . VRI inhibe la transcripción de *Clk* durante un tiempo, pero es luego reemplazado por PDP1 $\epsilon$  en el sitio de unión al DNA, lo que activa

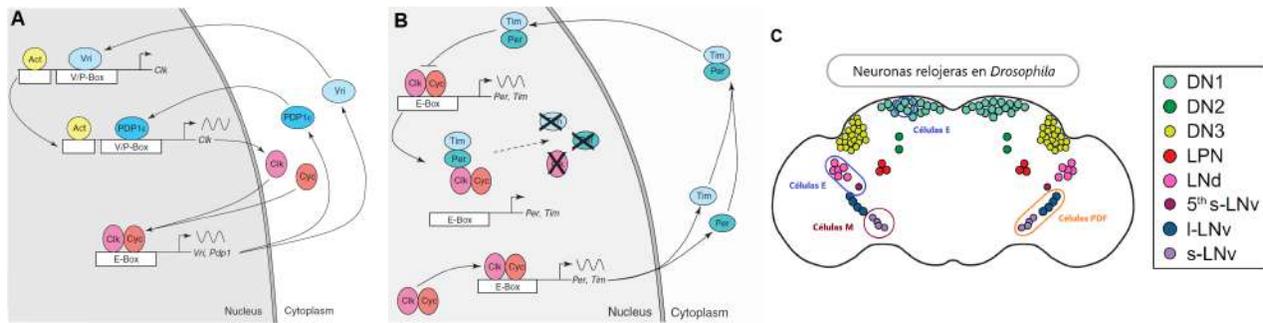


Figura 1: **A.** Esquema de ciclos de expresión-represión para el dímero CLK-CYC. Imagen tomada de Hardin (2005). **B.** Esquema de ciclos de expresión-represión para el dímero PER-TIM. Imagen tomada de Hardin (2005). **C.** Distribución de las neuronas relojeras en el cerebro de *D. melanogaster*. Los grupos neuronales catalogados como “células M”, “células E” y “neuronas PDF” solo se señalan en un hemisferio. Imágen tomada y traducida de Delventhal et al. (2019).

nuevamente la expresión de CLK. La expresión de *Cyc* sin embargo, es constitutiva (figura 1A). En el segundo ciclo, ocurre que el dímero CLK-CYC promueve también la expresión de *per* y *tim*, los cuales son inhibidos por sus productos protéicos PER Y TIM que traslocan al núcleo e intervienen la acción promotora de la transcripción de CLK-CYC (figura 1B).

### 1.3. El circuito circadiano en *D. melanogaster*

El patrón de expresión de los genes canónicos del reloj en el cerebro provee un marco para el entendimiento de la organización anatómica y funcional de los osciladores que controlan el comportamiento locomotor rítmico. El clonado del gen *per* y la producción de anticuerpos permitió determinar la expresión de PER en la cabeza de la mosca, estando presente en fotorreceptores del ojo compuesto y ocelo, en la glía, antenas y en un grupo definido de neuronas en el cerebro (Ewer et al., 1992) así como en el intestino, corazón, hígado (“fat body”), tubos de malpighi, gónadas y cutícula (Siwicki et al., 1998). Aquellos relojes funcionando fuera del cerebro se denominan osciladores periféricos (Plautz et al., 1997; Giebultowicz, 2001; Ito et al., 2008). Las neuronas que expresan el reloj molecular, fueron llamadas convenientemente “neuronas relojeras” (figura 1C) y estas son responsables de la regulación y mantenimiento de comportamientos circadianos de la mosca tales como el perfil de actividad diario (periodos de actividad-sueño)(figura 3A-B), la puesta de huevos y la eclosión de pupas (Cascallares et al., 2018; Guo et al., 2016; Delventhal et al., 2019). Los genes relojeros, regulan la ciclicidad de varios aspectos fisiológicos de manera tejido-específica, por ejemplo, mediante regulación de la transcripción de canales iónicos y receptores metabotrópicos en neuronas relojeras, diversas enzimas en el *fatbody*, receptores en organos sensoriales y enzimas digestivas en tejidos del intestino. La especificidad en la regulación es lograda a través de factores de transcripción específicos para cada tejido, relevantes para la afinidad entre los promotores y los TF relojeros (Meireles-Filho et al., 2014).

#### 1.3.1. El marcapasos central

En conjunto, las neuronas relojeras son denominadas reloj o marcapasos central. Se trata de 150 neuronas en las cuales los genes *per* y *tim* oscilan con una periodicidad cercana a 24 hs, y en el cerebro del adulto se dividen en 6 grupos de simetría bilateral en base a su localización. Estos grupos neuronales se diferencian entre sí no sólo por su localización neuroanatómica sino también

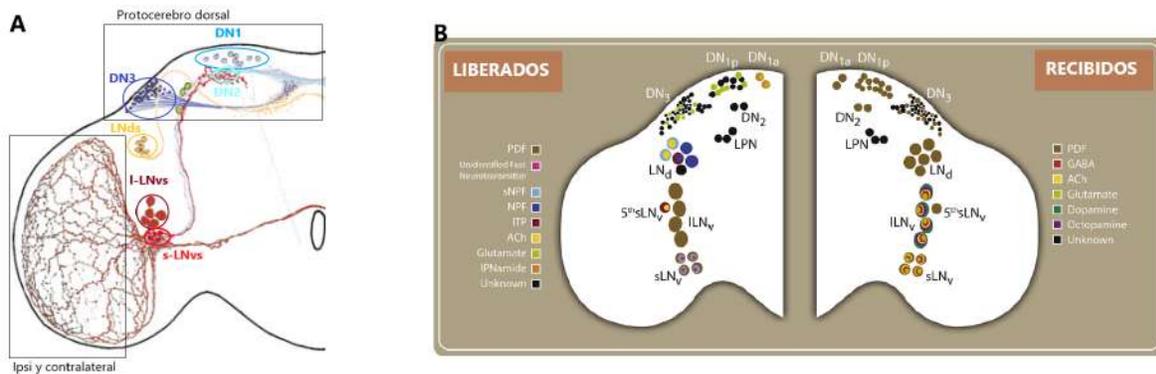


Figura 2: **A.** Esquema de la neuro-arquitectura de los grupos relojeros. Solo se muestra el hemisferio derecho del cerebro de *D.melanogaster*, ya que el otro hemisferio refleja la configuración mostrada. Imágen tomada de Helfrich-Förster (2003). **B.** Esquema de los grupos relojeros y los neurotransmisores y neuropéptidos que liberan-reciben. Imágen tomada de Muraro et al. (2013)

por la naturaleza de los péptidos y neurotransmisores que liberan. Están ubicadas en la zona lateral y dorsal del cerebro y es por eso que se las denomina neuronas laterales y dorsales respectivamente (LN y DN). Las neuronas laterales a su vez se dividen en cuatro grupos: neuronas ventrales laterales pequeñas (s-LNv), neuronas ventrales laterales grandes (l-LNv); neuronas laterales dorsales (LNd) y laterales posteriores (LNP). Por otro lado las Neuronas Dorsales se dividen en tres grupos conocidos como DN1, DN2 y DN3 (Figura 1C). Las neuronas dorsales DN1 se subdividen a su vez en un grupo más posterior, DN1p, y un grupo más anterior, DN1a. Las LNv también son conocidas como las neuronas PDF, puesto que, a excepción de la neurona denominada 5<sup>a</sup> s-LNv, expresan el neuropéptido PDF (Pigment Dispersing Factor) (Figura 1C) (Kaneko et al., 1997; Kaneko, Hall, 2000; Shafer et al., 2006; Helfrich-Förster et al., 2007). Respecto a la neuro-arquitectura del marcapasos, todos los grupos neuronales envían proyecciones al protocerebro dorsal donde sus terminales se superponen, a excepción de las l-LNvs que proyectan sus axones a la médula del lado ipsi y contralateral como se observa en la figura 2A (Helfrich-Förster, 2003). A pesar de la proximidad anatómica de las neuronas dentro de un mismo grupo, estas pueden no ser funcionalmente idénticas, puesto que pueden recibir y liberar distintos neurotransmisores o neuropéptidos, expresar distintos complementos de genes e incluso diferenciarse en las proyecciones axonales y dendríticas (figura 2A-B) (Muraro et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente, la actividad conjunta de las neuronas del circuito circadiano define un comportamiento locomotor rítmico robusto pero plástico a distintas condiciones ambientales, donde cada grupo neuronal juega un rol relevante en dicha plasticidad (Kumar, 2017). Sin embargo, existe una clara jerarquía en cuanto a la relevancia de la función de cada grupo neuronal para el control rítmico en ausencia de claves ambientales. Múltiples evidencias sugieren que el oscilador central de *Drosophila* se encuentra dentro de las s-LNv (Grima et al., 2004) y que el neuropéptido PDF juega un rol fundamental, ya que moscas que no expresan PDF (moscas con el alelo nulo pdf0) presentan claras alteraciones en la ritmicidad comportamental (Renn et al., 1999) así como una desincronización en las oscilaciones moleculares en los grupos dorsales (LNds y DN1) (Lin, 2004; Peng et al., 2003). Por estas razones, se ha postulado al neuropéptido PDF como un factor sincronizador del circuito circadiano (Choi et al., 2012).

Además de la ritmicidad en ausencia de claves ambientales, el reloj circadiano controla ciertos aspectos del comportamiento en ciclos de Luz-Oscuridad (LO). En *Drosophila*, además de la respuesta directa a las transiciones de fase, existen anticipaciones de cada una de ellas que se ma-

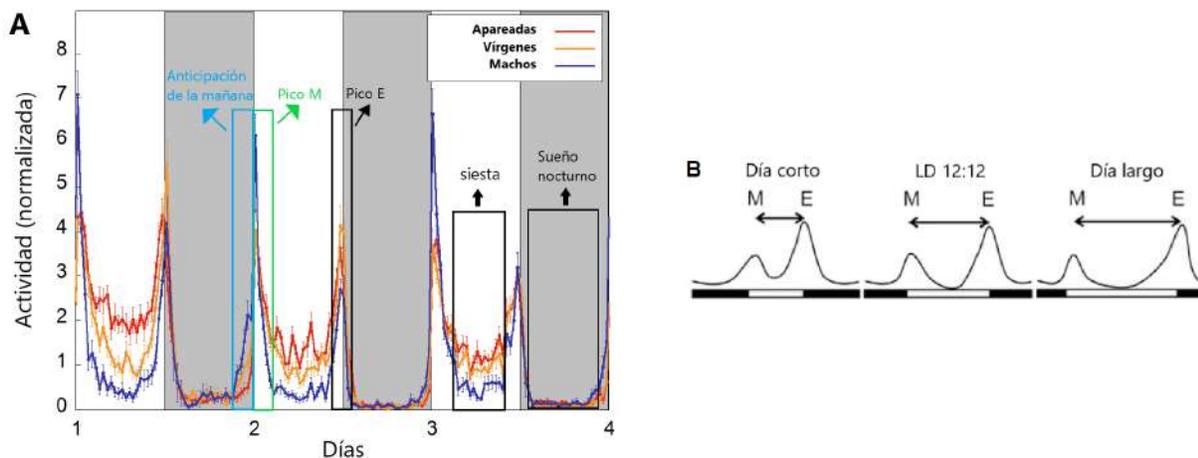


Figura 3: **A.** Actograma típico de machos (azul), hembras vírgenes (naranja) y hembras apareadas (rojo) wild type que muestra el perfil de actividad para varios días en ciclos de luz (barra blanca) y oscuridad (barra negra). **B.** Distribución de la actividad dependiente del largo de los días en *D.melanogaster*. Imagen tomada y traducida de Kumar (2017)

nifiestan como un incremento gradual de la actividad hacia el final del día (actividad de la tarde o pico E) y hacia el final de la noche (actividad de la mañana o pico M) (figura 3A-B). El periodo de menor actividad entre ambos picos durante el día se denomina "siestaz durante la noche" "sueño nocturno" (figura 3A-B). La anticipación al cambio de fase es un aspecto del comportamiento en LO que está controlado por el sistema circadiano. Los primeros estudios establecieron un modelo de regulación relativamente simple llamado *modelo del oscilador dual*, el cual propone que los dos picos de actividad observados están controlados por grupos de neuronas diferentes oscilando de manera independiente (Helfrich-Förster, 2001). Tradicionalmente, el oscilador de la mañana (Células M) lo conforman las cuatro neuronas PDF-positivas s-LNVs, y el de la tarde (Células E) la neurona PDF-negativa 5th s-LNVs, 3 neuronas CRY-positivas LNds y 6-8 neuronas DN1s formando el subgrupo DN1ps (se habla cantidad de neuronas por hemisferio) (Jaumouillé et al., 2021) (figura 1C). Las células M son suficientes y necesarias para generar la anticipación de la mañana y el pico M, mientras que las células E son responsables de generar el pico de la tarde en ciclos LO. La ablación neuronal, el silenciamiento neuronal y/o mutantes nulos para *per* en las neuronas osciladoras M o en las osciladoras E muestran la completa pérdida del pico M o E respectivamente en periodos de LO (Jagota et al., 2000; Stoleru et al., 2004). El ajuste comportamental de las moscas a diferentes periodos de luz-oscuridad, como ocurre con el acortamiento-alargamiento de días según la estación del año, se da con un ajuste de la periodicidad de los osciladores (Jagota et al., 2000; Yoshii et al., 2004) (figura 3B). Varios experimentos apuntaron a que el oscilador central de este modelo se encuentra en las células M (s-LNv) (Yao, Shafer, 2014; Chatterjee et al., 2018).

Sin embargo, hay una serie de estudios que desafían este modelo. Se ha mostrado que existe una red más complicada de regulación, donde hay más grupos neuronales en juego, ciclos de retroalimentación negativa y positiva entre las células M y E, cambios diarios de la conectividad entre estos grupos, y los osciladores en las neuronas PDF no jugarían un rol tan central en la generación de ritmo locomotor (Dissel et al., 2014; Gorostiza et al., 2014; Jaumouillé et al., 2021; Bulthuis et al., 2019; Duhart et al., 2020). Experimentos de rescate de expresión de *per* solo en DN1ps en moscas *per* nulas (*per0*) fue suficiente para recuperar el pico M, aunque todavía estas neuronas dependen de la señalización por PDF (Zhang et al., 2010a). Se ha demostrado también que bajo condiciones

de luz tenue, las DN1ps pueden dirigir la actividad de la tarde por si solas. De esta manera, las neuronas DN1p constituirían el principal camino de salida del oscilador matutino y hasta también serían suficientes para cumplir el rol de oscilador de la tarde bajo ciertas condiciones (Dissel et al., 2014; Jaumouillé et al., 2021). Sorprendentemente, la oscilación de PDF en el protocerebro dorsal, tan importante para la sincronización del resto de los osciladores (Park, 2000), se ve afectada por la inhibición de la liberación tanto de glutamato como de acetilcolina por parte de las células E (Duhart et al., 2020). Se ha demostrado el *input* sináptico excitatorio de las células E a las M, el cual es especialmente fuerte durante la tarde debido a la remodelación estructural de sus neuritas a lo largo del día, consecuentemente haciendo que la fuerza de la sinapsis entre ellas varíe circadianamente. (Duhart et al., 2020). Las células E a su vez se ven inhibidas durante el periodo de siesta por la acción de un subgrupo de neuronas DN1p, las cuales a su vez son activadas por las células M durante la mañana (Guo et al., 2016).

En cuanto a los ritmos circadianos en oscuridad constante (OO, o condición de libre curso) la células M también tienen un peso relativamente más importante que el resto en el mantenimiento del ritmo locomotor, ya que son estrictamente necesarias para generar y mantener dicho ritmo (Renn et al., 1999). Manipular la velocidad del oscilador molecular de las células M modifica el periodo del ritmo circadiano en OO, aunque también se observó un efecto similar con la manipulación del oscilador de neuronas PDF-. (Yao, Shafer, 2014; Chatterjee et al., 2018; Dissel et al., 2014; Jaumouillé et al., 2021). Se ha mostrado que las células E también tienen cierta relevancia en el mantenimiento de un ritmo locomotor robusto en OO a través de la inhibición por glutamato de sus contactos postsinápticos; presumiblemente las células M o las DN1ps (Bulthuis et al., 2019).

Todos estos resultados demuestran que la responsabilidad por los picos de actividad y el mantenimiento de un ritmo locomotor coherente en LO y OO, es compartida en cierta medida por ambos osciladores M y E, con la intervención de principalmente del grupo DN1. En la figura 4A se resume el paradigma actual del circuito relojero que regula el patrón de actividad diario de *D.melanogaster*.

### 1.3.2. El rol de las neuronas DN1ps

Dentro de las neuronas DN1p, hay un subconjunto de 8 neuronas glutamatérgicas (desde ahora mencionadas solo por comodidad, DN1ps) que da forma de manera más sutil al patrón locomotor y a la estructura del sueño. Cuando se silencian durante todo el desarrollo, la actividad durante la vigilia se ve ligeramente reducida y hay una importante disminución del sueño tanto diurno como nocturno. Interesantemente, esta reducción se da por una disminución en la duración de los episodios (bouts) de sueño y no por su cantidad (Guo et al., 2016). La activación de las DN1ps en adultos durante parte de la tarde y toda la noche, provoca la pérdida del pico E aumentando el ancho de la siesta hasta que esta se fusiona con el sueño nocturno (figura 5A-B) (Guo et al., 2016). En aspectos generales, este subgrupo neuronal parece ser promotor del sueño y en especial del diurno. En Guo et al. (2016) se describió el circuito de retroalimentación negativa que explica estos resultados: las DN1p establecen contactos presinápticos con las células M y presentan su pico de actividad por la mañana, lo cual provoca posteriormente la inhibición de la actividad sus contactos post-sinápticos, las células E, lo que da lugar al periodo de la siesta. Luego las DN1ps reducen su actividad acercándose al atardecer, permitiendo entonces el accionar del oscilador E y provocando el aumento de actividad que finalmente se observa como el pico de la tarde. La figura 5C esquematiza el circuito descripto.

Cabe mencionar también, que las DN1ps muestran un perfil de disparo diario sexualmente dimórfico. En machos, ocurre un patrón unimodal donde su mayor actividad es por la mañana hasta aproximadamente el mediodía, mientras que en hembras, este pico se encuentra durante la noche (Guo et al., 2016).

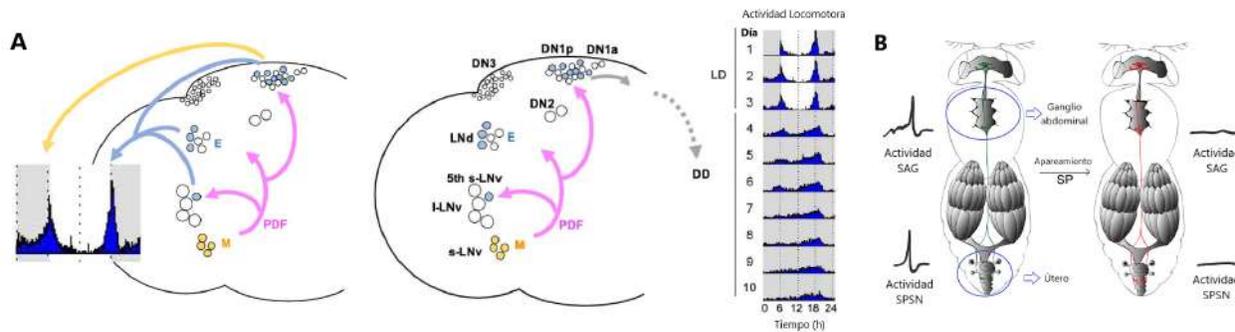


Figura 4: **A.** Diagrama del modelo actual de organización circuital del marcapasos circadiano en *D. melanogaster* Imagen tomaday traducida de (Jaumouillé et al., 2021)  
**B.** Ilustración esquemática del efecto de SP sobre las neuronas SPSN y SAG en *D. melanogaster*. Imagen tomada y traducida de (Feng et al., 2014).

#### 1.4. Efectos post-cópula

La cópula en general induce cambios en el patrón de actividad de las hembras en muchas especies (Isaac et al., 2010). En *D. melanogaster* ocurren una serie de cambios en el comportamiento denominados efectos post-cópula, los cuales fueron descritos por varios trabajos e incluyen reducción en la receptividad, aumento en la producción y la puesta de huevos, estimulación del sistema inmune y hasta cambios en las preferencias nutricionales (Helfrich-Förster, 2000; Bloch Qazi et al., 2003; Peng et al., 2005; Isaac et al., 2010; Ribeiro, Dickson, 2010). A pesar de que el patrón locomotor de las hembras vírgenes en *D. melanogaster* es muy parecido al de los machos, con los dos picos de actividad que empiezan antes de que se prendan o apaguen las luces, separados de un periodo de inactividad o periodo de siesta (figura 3A, línea azul), luego del apareamiento también sufren cambios drásticos en su comportamiento locomotor (figura 3A, línea roja). Muestran mucha actividad durante el día, pierden la anticipación de la mañana y tienen una pérdida considerable de hasta el 70 % del sueño diurno comparado con los machos. Presumiblemente, el menor sueño diurno es causado por una mayor necesidad de forrajeo y la búsqueda activa de lugares para oviponer sus huevos. Estos comportamientos duran aproximadamente 8 días (Isaac et al., 2010). Se han descrito en parte los circuitos neuronales responsables de los cambios comportamentales que ocurren en las hembras luego de la cópula, a los que se denominaron como respuestas de post-cópula, además de algunos mecanismos y especies moleculares intervinientes en el proceso. El denominado Péptido Sexual (SP, por sus siglas en inglés) es un péptido de 36 residuos presente en el esperma de los machos que se adhiere a la superficie de las gametas y se transfiere a las hembras durante la cópula. Una vez en el útero éste se une a su receptor específico, el Receptor del Péptido Sexual (*Sex Peptide Receptor*, SPR), presente en 4-6 neuronas sensoriales con terminales dendríticas que inervan el tracto reproductivo. Estas neuronas se denominan Neuronas Sensoriales del Péptido Sexual (*Sex Peptide Sensing Neurons*, SPSNs) y co-expresan los genes *fruitless (fru)*, *doublesex (dsx)*, marcadores con funciones sexo-específicas, y *pickpocket (ppk)*, un marcador para neuronas propioceptivas (Häsemeyer et al., 2009; Rezával et al., 2012; Yang et al., 2009). Se ha demostrado que las neuronas SPSNs conectan con las neuronas SP del ganglio abdominal (*SP abdominal ganglion*, SAG) *dsx+* y estas a su vez proyectan neuritas al protocerebrum dorsal (figura 4B) (Feng et al., 2014). Sorprendentemente, la inhibición de la expresión de SPR en las neuronas SPSNs es suficiente para restablecer el patrón de actividad característico de las hembras vírgenes. Además, el bloqueo de la conexión sináptica de las SPSNs o de las SAG, también restablece un patrón locomotor virgen (Feng et al.,

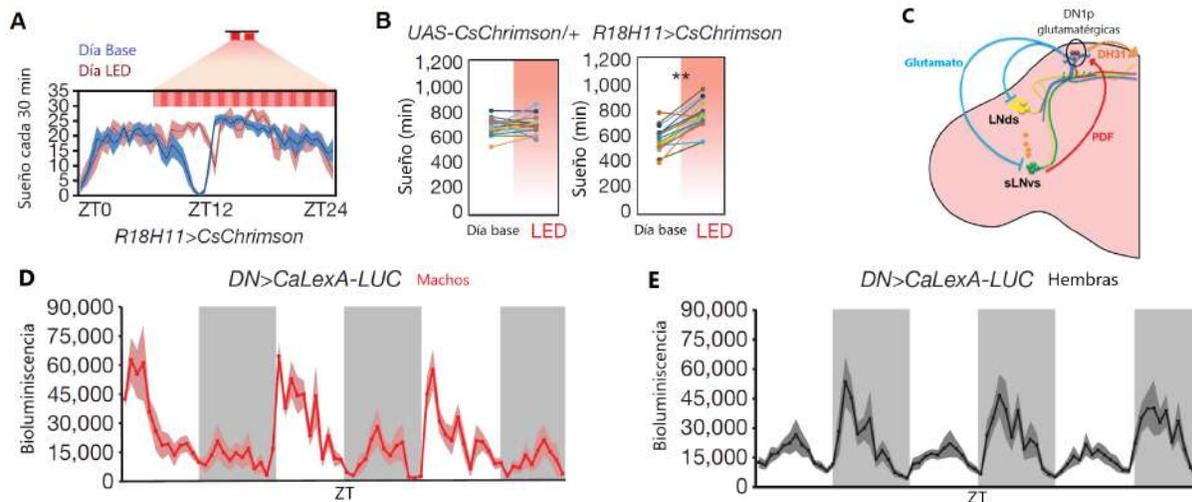


Figura 5: **A.** Sueñograma del día de referencia o base (en azul) en el cual las DN1ps solo eran iluminadas con luz blanca y del día de estimulación (en rojo) cuando se las iluminó con pulsos de LEDs rojos a las moscas experimentales. La barra rosa representa el horario de iluminación con luz roja. **B.** Cuantificación de sueño ganado y perdido entre el día de referencia o base (fondo blanco) y el día de estimulación LED (fondo rosa) durante ZT 7-12. **C.** Esquema del circuito que regula la siesta en machos de *D.melanogaster*. **D - E.** Perfil de actividad diario de las neuronas DN1p glutamatergicas en machos y hembras correspondientemente. Todas las imágenes fueron tomadas y traducidas de Guo et al. (2016).

2014). Se ha demostrado que SP inhibe a las neuronas SAG por medio de la inhibición de las SPSN, y que esto resulta crítico para los cambios observados en distintas respuestas de post-copula de las hembras apareadas (Yang et al., 2009; Häsemeyer et al., 2009; Rezával et al., 2012; Feng et al., 2014).

### 1.5. Modulación aguda neuronal: optogenética

Las técnicas optogenéticas permiten la manipulación de la actividad neuronal con la precisión temporal de milisegundos. Estas poderosas técnicas consisten en la expresión transgénica de channelrodopsinas en neuronas de interés, para posterior exposición a ciertas longitudes de onda que activen o repriman su disparo, lo cual en última instancia permite la disección funcional de la red neuronal en la generación de algún output comportamental o fisiológico (Klapoetke et al., 2014).

Las channelrhodopsinas son un grupo de canales iónicos transmembrana sensibles a la luz presentes naturalmente en archeas, bacterias y algas. Se han descrito y caracterizado varias channelrodopsinas para uso optogenético, entre las cuales se puede nombrar a CsChrimson, C1V1, Chronos, ReaChR, ChR2, VChR1 y TsChR; todas aisladas de varias especies de algas. Cada una de ellas, posee un intervalo de longitudes de onda particular para las cuales son sensibles, abriéndose y permitiendo la despolarización de la membrana celular (Klapoetke et al., 2014). Dado que la penetrancia de la luz dentro de los tejidos de la mosca es diferente a lo largo del espectro de luz visible, no todos los canales mencionados se pueden utilizar indistintamente. Longitudes de onda más largas tienen mejor penetrancia, mientras que lo contrario se observa para ondas más cortas. Por lo tanto, aquellas channelrhodopsinas activadas por luz azul solo se han usado para la activación de neuronas en estadios larvales y en la cutícula, y aquellas sensibles a luz roja han sido las usadas en adultos y en neuronas más internas (Honjo et al., 2012; Simpson, Looger, 2018). Se ha logrado activación

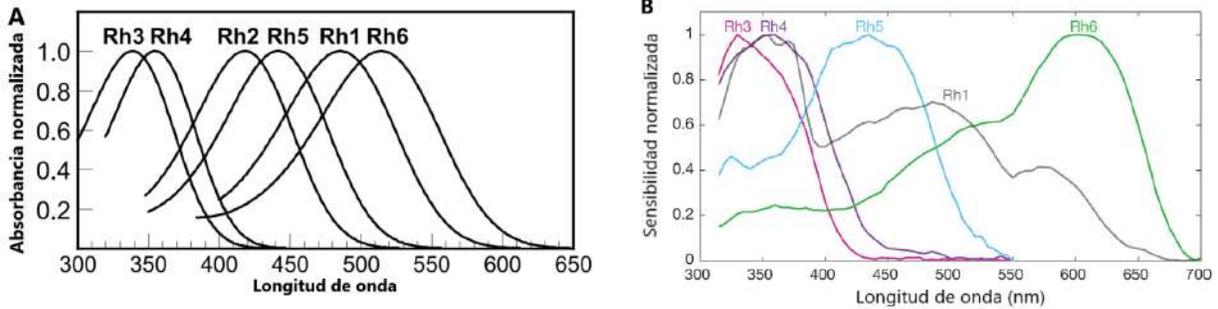


Figura 6: **A.** Primeras estimaciones del espectro de absorción de los pigmentos visuales Rh1, Rh3, Rh4, Rh5 y Rh6 de *D.melanogaster*. Imágen tomada y traducida de Salcedo et al. (1999). **B.** Curvas de sensibilidad espectral normalizada de los mismos pigmentos visuales Rh1, Rh3, Rh4, Rh5 y Rh6 más recientemente medidos en moscas de ojos rojos. Imágen tomada y traducida de Sharkey et al. (2020)

neuronal optogenética para desencadenar comportamientos típicos de cortejo como la extensión de alas y contracción abdominal, efectos reflejo como la extensión de probocis y modulación de actividad diaria como la pérdida del pico de la tarde (Klapoetke et al., 2014; Inagaki et al., 2014; Paoletti et al., 2019)

La ventaja de usar channelrhodopsinas activadas por luz roja no está sólo en la mejor penetrancia de la señal de activación, sino que también permite evitar efectos propios de la luz en la respuesta de la mosca cuando es iluminada. En primera instancia, se creía que *D.melanogaster* no percibía las longitudes de onda cercanas al rojo (figura 6A) (Feiler et al., 1992; Salcedo et al., 1999). Sin embargo, estudios posteriores que midieron el espectro de absorción de los pigmentos presentes en su ojos, determinaron que uno de ellos tiene una cola en su espectro de absorción que llega hasta longitudes de onda roja (Sharkey et al., 2020) (figura 6B). Por ende, con suficiente intensidad, las moscas serían capaces de percibir la luz roja e interpretarla como una clave lumínica.

En trabajos preliminares del laboratorio en donde se desarrolló este trabajo, se armó un circuito de estimulación fotónica comandado por un microprocesador Arduino, el cual se calibró mediante la expresión de Chrimson en neuronas *fruitless*. Estas neuronas controlan un movimiento de cortejo en los machos que puede observarse claramente. De esta manera, se probaron distintas longitudes de onda, tiempos e intensidades de luz hasta determinar los parámetros adecuados para lograr la activación efectiva de los canales iónicos.

## 2. Objetivos del trabajo

Para poder estudiar circuitos neuronales es deseable poder activar o inhibir la actividad neuronal de forma específica y de manera aguda, ya que la activación o inhibición a lo largo de todo el desarrollo, como se hace mediante las técnicas tradicionales de *knockout* o la expresión constitutiva de canales iónicos, puede generar mecanismos compensatorios que impidan ver una respuesta comportamental clara. La optogenética es una poderosa técnica para evitar este problema, aunque su puesta a punto para cada contexto metodológico y experimental específico constituye un desafío.

Teniendo en cuenta los resultados preliminares mencionados en la sección anterior, el **objetivo general** de este trabajo es la evaluación de la utilidad del enfoque optogenético en el estudio de los comportamientos de sueño y actividad locomotora circadiana de *D. melanogaster*.

A continuación, se detallan los objetivos particulares del presente trabajo:

- **Objetivo particular 1: Modulación de la actividad de las neuronas DN1ps**

**Sub-objetivo particular 1.1:** *Reproducción de resultados conocidos en la modulación de la actividad de las neuronas DN1p.* En este objetivo, mediante el driver R18H11 se expresará Chrimson en las neuronas glutamatérgicas DN1ps, las cuales controlan el sueño diurno y modulan el pico de la tarde E mediante un ciclo de retroalimentación negativa disparado por las células M (Guo et al., 2016). Se espera que la activación vespertina de las DN1ps reduzca o anule completamente el pico E reproduciendo los resultados en Guo et al. (2016) (figura 5A).

**Sub-objetivo particular 1.2:** *Estudio del rol de las DN1p en el control de la siesta en hembras apareadas.* Dado que en las hembras apareadas las DN1ps poseen un patrón de disparos diario diferente al de los machos (Guo et al., 2016), se estimularán estas neuronas durante la mañana en un intento por simular el patrón de activación que ocurre en machos. Se espera que esto provoque una siesta mas pronunciada en las moscas que expresen Chrimson en comparación con las controles.

- **Objetivo particular 2: Modulación de la actividad de las neuronas PDF**

**Sub-objetivo particular 2.1:** *Estudio del rol de las neuronas PDF en la modulación de la anticipación de la mañana en hembras apareadas.* Para este objetivo se expresará Chrimson en las neuronas PDF. Bajo la hipótesis de que estas neuronas modulan la pérdida de anticipación de la mañana tras la cópula, se espera que al activar dichas neuronas en hembras copuladas, estas recuperen la anticipación asimilándose su comportamiento al de las hembras vírgenes.

**Sub-objetivo particular 2.2:** *Exploración en busca de dimorfismos sexuales o de estado reproductivo en la activación matutina y vespertina de las neuronas PDF.* Se activarán las neuronas PDF-positivas por la tarde y mañana en machos, hembras vírgenes y hembras apareadas en busca de dimorfismos sexuales y/o de estado reproductivo en el accionar de este grupo neuronal.

## 3. Metodología

### 3.1. El sistema UAS-GAL4

El sistema heterólogo proveniente de levadura UAS-Gal4 es una herramienta muy útil para dirigir la expresión de un gen de interés en un tejido o células determinadas (Brand, Perrimon, 1993). La base de este sistema es la afinidad del factor de transcripción GAL4 por la secuencia UAS (Upstream Activating Sequence). Una línea transgénica que expresa GAL4 bajo un promotor específico de tejido (Promotor X), denominada línea inductora, se cruza con otra que expresa un gen Y bajo la secuencia UAS (línea UAS-gen Y). Luego en la progenie, que tendrá ambos constructos génicos, el gen de interés (Y) se expresará sólo en los tejidos elegidos marcados por el promotor X (Figura 7A).

### 3.2. Mantenimiento de las líneas empleadas

El mantenimiento de los stocks de líneas transgénicas y cruzamientos se realizaron en viales de plástico de 2 cm de diámetro y 10 cm de altura conteniendo medio estándar de polenta (polenta de cocción lenta 6,65 % m/v, sacarosa 4 % m/v, agar bacteriológico 1 % m/v, levadura en polvo 2 % m/v, nipagín 0,7 % v/v y ácido propiónico 0,4 % v/v). El laboratorio cuenta con 4 incubadoras que permiten controlar las condiciones de luz, temperatura y humedad. Las líneas en stock y los

cruzamientos fueron mantenidos en estas incubadoras a 25 °C y en ciclos de 12 horas de luz (8 AM - 8 PM) y 12 de oscuridad (8 PM - 8 AM), siendo la luz el Zeitgeber (en alemán, dador de tiempo) que entrena el reloj molecular de las moscas. Para describir el paso del tiempo en función de este Zeitgeber, se hablará de ahora en adelante de “Zeitgeber Time” (ZT). Los stocks fueron mantenidos en una incubadora a 20 °C.

Para seleccionar individuos según sexo, presencia o ausencia de cromosomas balanceadores, color de ojos, etc., las moscas se observaron bajo la lupa sobre una plataforma porosa a través de la cual se filtra  $CO_2$ , gas que en las moscas tiene efecto anestésico. Los cruzamientos normalmente consistieron en 3 hembras por cada 2 machos. Se agregó una pequeña cantidad de levadura hidratada a cada vial para optimizar la ovipuesta.

#### ■ Genotipos utilizados

Línea transgénica	Fuente	Identificador
w[1118]; Py[+t7.7] w[+mC]=GMR18H11-GAL4attP2	Bloomington Stock Center	Drosophila BDSC: 48832
w[1118]; Py[+t7.7] w[+mC]=20XUAS-IVS-CsChrimson.mVenusattP2	Bloomington Stock Center	Drosophila BDSC: 55136
y[1] w[*]; Pw[+mC]=Pdf-GAL4.P0.52; Pw[+mC]=Pdf-GAL4.P0.53	Bloomington Stock Center	Drosophila BDSC: 80939

### 3.3. Nomenclatura de *D. melanogaster*

*D. melanogaster* es un organismo diploide que cuenta con un par de cromosomas sexuales (el par 1 que es XX en hembras y XY en machos) y 3 autosomas (el par 2, 3 y 4). El cromosoma Y suele presentar estructura heterocromática por lo que no expresa muchos genes. De los 3 autosomas, el cuarto es muy pequeño, contiene muy pocos genes y por eso muchas veces es ignorado.

En *D. melanogaster* el genotipo de cada mosca se escribe de una manera estandarizada. El detalle de cada cromosoma se separa con punto y comas “;” y de izquierda a derecha se nombra desde el par 1 al 4. Cromosomas homólogos se separan por una barra inclinada “/” y los cromosomas que corresponden a cada parental se colocan ordenados hacia la izquierda y la derecha de dicha barra. Si el genotipo de un cromosoma es el mismo para ambos parentales, se lo indica sólo una vez sin poner la barra. Por otra parte, si el genotipo para un cromosoma es salvaje se indica con un +. Si el genotipo de los pares de cromosomas hacia los extremos es salvaje no se indica para resumir. Además “>” puede ser usado también en descripciones resumidas, aunque no especifica si los elementos a la izquierda y derecha se encuentran en un mismo cromosoma o no.

A continuación se presenta un ejemplo de genotipo extendido y resumido.

Ejemplo extendido: Pdf – Gal4/Pdf – Gal4; UAS – Chrimson/UAS – Chrimson

Ejemplo resumido: Pdf – Gal4 > Chrimson

### 3.4. Manipulación optogenética de la actividad neuronal

Se utilizó el sistema UAS-Gal4 para expresar de manera dirigida al grupo neuronal de interés la channelrhodopsina CsChrimson, la cual provoca la despolarización de la membrana celular desencadenando el disparo neuronal cuando es estimulada con luz roja (640 nm) para luego analizar el efecto de esta activación en la actividad locomotora de la mosca. Para este fin, se dispone de un montaje especial detallado en la figura 7B. La estimulación lumínica consiste en pulsos de 15 ms con

una frecuencia de 10 Hz durante varias horas usando luces LED de alta potencia (1 W) colocadas aproximadamente a 2 cm de las moscas. Se estimula con pulsos en vez de con luz continua, dado que la luz continua es perjudicial para la cinética de apertura de los canales, dejándolos abiertos indefinidamente y provocando la despolarización de las neuronas que termina silenciándolas en vez de activándolas (Klapoetke et al., 2014). Los parámetros de la estimulación fueron decididos en base a estudios previos que determinaron rangos de duración de pulsos y frecuencias que mejor estimulaban el disparo neuronal (Klapoetke et al., 2014; Guo et al., 2016), así como en nuestra propia experiencia usando el método en trabajos anteriores del laboratorio.

### 3.4.1. Inducción con retinal

Las moscas fueron alimentadas con retinal de 24 a 48 hs antes de cada experimento. El retinal es un cromóforo derivado de la vitamina A naturalmente presente desde bacterias hasta animales, el cual se une a los canales CsChrimson y permite que estos se vuelvan sensibles a la luz (Seki et al., 1998). El retinal se foto-isomeriza expuesto a luz ultravioleta, pero su interacción con aminoácidos cambia su espectro de absorción y le da la foto-sensibilidad característica al canal iónico. La foto-isomerización del retinal dispara el cambio conformacional de la proteína que da lugar al paso de iones a través de la membrana (Wald, 1968).

Durante la preparación de medio estándar de polenta, se agrega retinal con una concentración de 400uM según el protocolo detallado en (Guo et al., 2016) cuando el preparado se encuentra tibio. Se alicuota en los mismos viales que la comida sin retinal, y luego se cubren con papel aluminio para evitar la exposición directa a la luz.

Para experimentos LO, las moscas son expuestas a ciclos LO de 12-12 hs (ZT 0 = 8 AM, ZT 12 = 8 PM) previo al experimento para entrenamiento del reloj, y para condiciones OO se las restringe de luz blanca durante toda su vida adulta. En esta última condición, las moscas se conservan en una incubadora en completa oscuridad y su manipulación se hace con luz tenue roja para evitar la apertura de los canales Chrimson y la percepción de luz por parte de las moscas.

### 3.5. Monitoreo de la actividad locomotora

Para el monitoreo de la actividad locomotora se utilizó un setup donde las moscas se colocan de forma individual en una serie de pistas transparentes (cada pista mide 8 mm (ancho)  $\times$  8 mm (altura)  $\times$  80 mm (longitud)). Un extremo de la pista está sellado y contiene aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de medio estándar de banana (bananas maduras 40 % m/v, azúcar negra 7 % m/v, agar bacteriológico 2,5 % m/v, cebada 5 % m/v, levadura 7,2 % m/v, alcohol etílico 4,4 % v/v, nipagin 0,4 % m/v), mientras que el otro extremo se cierra con un tapón de algodón. Las moscas fueron expuestas a un ciclo de 12 horas de luz blanca (200 lux, leds blancos) y 12 horas de completa oscuridad para experimentos en LO y 24 horas de completa oscuridad para experimentos en OO (ZT 0 = 8 AM, ZT 12 = 8 PM). Para permitir la grabación durante la noche, se utiliza luz infrarroja la cual está por fuera del rango de sensibilidad de las moscas. Las cámaras web utilizadas para el seguimiento (Genius Facecam 1000) permiten registrar la actividad de la mosca tanto durante el día como durante la noche ya que se les quitaron manualmente los filtros infrarrojos. La señal de video es enviada a una computadora donde se utiliza un programa generado por el laboratorio para registrar el movimiento de cada mosca en tiempo real. El software de seguimiento da una lectura por segundo de la posición de la mosca, y estas lecturas se guardan en un archivo de texto. Al restar los resultados de lecturas consecutivas, se pueden transformar en una serie de tiempo discreta donde cada valor representa el desplazamiento de la mosca durante un segundo. Todos los análisis se realizaron usando un software desarrollado en el laboratorio en donde se realizó el presente trabajo. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C.

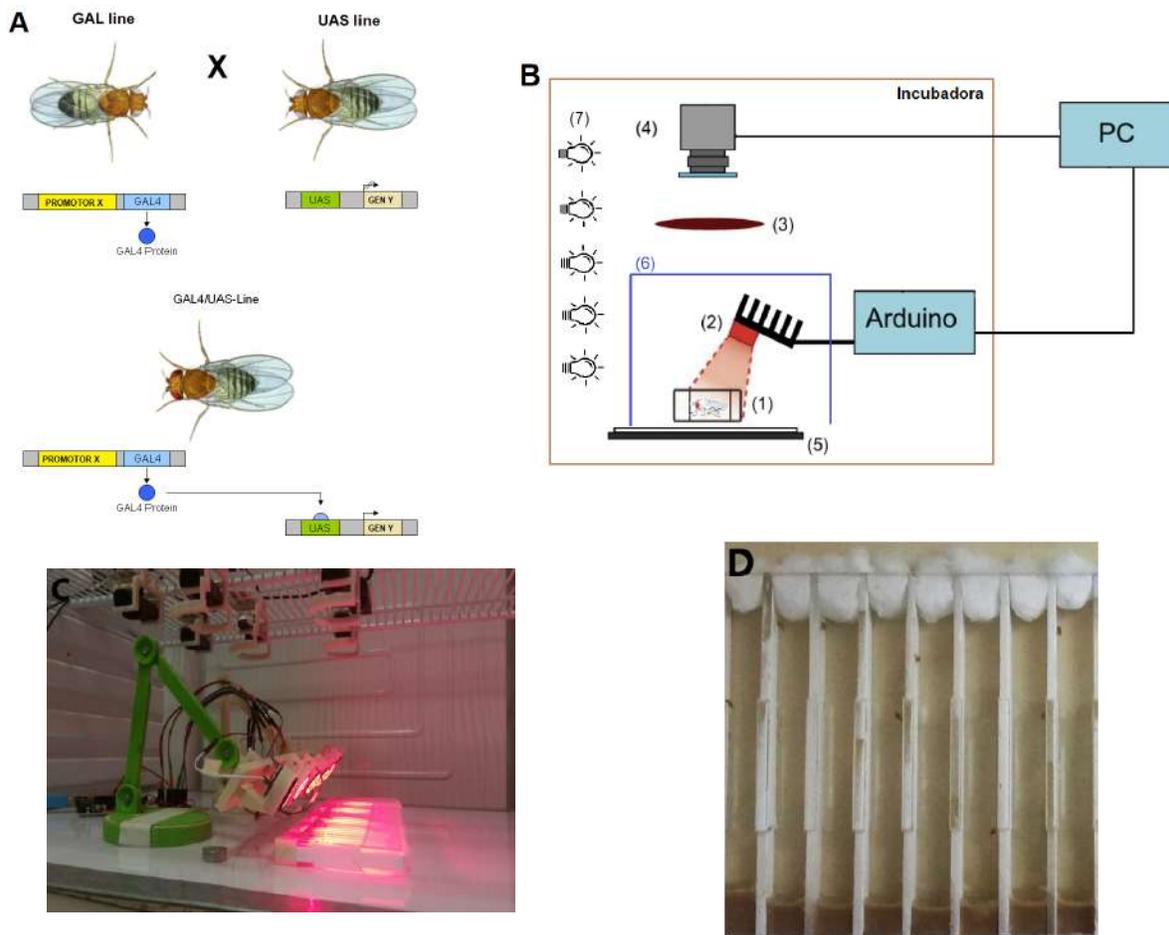


Figura 7: **A.** Diagrama explicativo de los cruzamientos de las moscas transgénicas. **B.** Montaje experimental diseñado para las grabaciones. En (1) se encuentran las moscas dentro de las pistas. La misma es iluminada por un sistema de LEDs (2) cuyos pulsos (intensidad, frecuencia, duración y hora del día en el cual iluminar) son controlados por un microcontrolador Arduino. Para obtener las grabaciones y monitoreo de las moscas, se utilizan webcams a las que se le quitaron manualmente los filtros infrarrojos (4). Para evitar los reflejos de luz dados por los LEDs que pueden ser captados por la cámara como movimiento, se utiliza un filtro de luz roja entre la cámara y la muestra (3). La luz blanca de la incubadora (7) podría generar la apertura de los canales, por lo que se coloca un filtro de luz roja cubriendo los LEDs y pistas (6). Finalmente, un set de LEDs infrarrojos (5) por debajo de las pistas permite la iluminación necesaria para el trackeo nocturno. La luz infrarroja no es percibida por las moscas. **C.** Foto del montaje experimental descrito en B. **D.** Foto de las pistas en donde se encuentran las moscas. Cada pista tiene una mosca que es monitoreada individualmente por el software del laboratorio.

### 3.6. Análisis de datos

Todos los datos recogidos del tracker, fueron analizados y graficados usando Gnu-plot en bash (Cuantificación del sueño, actividad e índices de anticipación de la mañana) y el lenguaje de programación R en Rstudio (Plot de substracción y fold change en sueño)

### ■ Cuantificación del sueño

Para determinar la cantidad de sueño se usa la definición ya estándar en *D. melanogaster* que clasifica como sueño aquellos intervalos de tiempo de más de 5 minutos en los que la mosca ha estado inmóvil (Pfeiffenberger et al., 2010), o se ha movido menos que un cierto valor umbral (2mm por segundo, o un cuerpo de mosca (body length)). Se cuantificó el tiempo total que la mosca permanece en dicho estado en intervalos (bines) de media hora.

### ■ Cuantificación de la actividad

La actividad se cuantifica en distancia recorrida de la mosca por cada bin de media hora. Luego, se normaliza para evitar que las moscas que son muy activas no dominen el actograma promedio. A continuación se detalla dicha normalización:

$$\text{Actividad moscas}_{ij} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \left( \frac{\text{Distancia recorrida mosca}_{ijn}}{\text{Promedio distancia recorrida total}_{jn}} \right) \quad (1)$$

$i = 1, 2, 3, \dots, I$  (bines de todo el experimento)

$j = 1, 2$  (genotipo/tratamiento, control)

$n = 1, 2, 3, \dots, N$  (moscas)

### ■ Plot de substracción

Para describir con detalle como cambia el patrón de descanso a lo largo del día cuando se activan las neuronas de interés, se muestra la diferencia en la cantidad de sueño bin-a-bin entre el día de estimulación con luz (día LED) y el día anterior a este (día base). La siguiente ecuación detalla dicho cálculo:

$$\text{Diferencia en sueño}_{ij} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (\text{sueño día LED}_{ijn} - \text{sueño día base}_{ijn}) \quad (2)$$

$i = 1, 2, 3, \dots, 48$  (bines ZT 0-24)

$j = 1, 2$  (genotipo/tratamiento, control)

$n = 1, 2, 3, \dots, N$  (moscas)

Para evaluar la significancia estadística de las diferencias de sueño observadas entre el día de estimulación LED y el día base, se ajustó un modelo lineal generalizado (*generalized Linear model*, GLM) solo para el genotipo tratado (el que expresa Chrimson o el que fue alimentado con retinal) de cada experimento. Luego se calcularon las medias ajustadas y se realizaron contrastes ortogonales y a-priori para cada bin de ZT 0 - 12 (en el caso de estimulación LED por la mañana) y de ZT 7 - 24 (en el caso de estimulación LED por la tarde) entre el día de estimulación y el día base. El P-valor de los contrastes fue ajustado por comparaciones múltiples por el método de Bonferroni.

### ■ Fold change en sueño

Para demostrar cuantitativamente el efecto diferencial de la estimulación LED sobre los genotipos o tratamientos, se calculó el logaritmo de base dos del fold change en sueño del genotipo/tratamiento de interés respecto a sus controles. La siguiente ecuación detalla el cálculo:

$$\text{Cambio en sueño}_j = \frac{1}{24/34} \sum_{i=0/14}^{12/48} \left( \log_2 \frac{\text{media de sueño moscas tratadas}_{ij}}{\text{media de sueño moscas controles}_{ij}} \right) \quad (3)$$

$i = 14, 15, 16, \dots, 48$  (bines ZT 7-24)

$j = 1, 2$  (día LED, día base)

Además, se realizó un t-test pareado con corrección de Welsh para cada bin entre el día base y el día LED. Se testeó por normalidad de la distribución de los grupos mediante el test Shapiro-Wilks. En caso de que no se cumpliera normalidad, se optó por un análisis no paramétrico; el test de Wilcoxon.

### ■ Índice de anticipación de la mañana

Para cuantificar la anticipación de la mañana (IAM) a partir de la actividad observada, se usaron dos índices calculados de la siguiente manera.

Índice 1:

$$\text{IAM}_{jk} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left( \frac{\text{Promedio de la actividad ZT 21-24 mosca}_{jkn}}{\text{Promedio de la actividad ZT 18-24 mosca}_{jkn}} \right) \quad (4)$$

Índice 2:

Primero se ajusta por mínimos cuadrados una recta por mosca a la actividad de las últimas 6 horas del día zeitgeber (ZT 18-24)

$$\text{Actividad}_{ijkn} = B0_{jkn} + B1_{jkn} * i + \epsilon \quad (5)$$

Luego, se calcula el promedio de las pendientes de dichas rectas para cada día y genotipo/tratamiento.

$$\text{IAM}_{jk} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N B1_{jkn} \quad (6)$$

$j = 1, 2, 3, \dots, J$  (días del experimento)

$k = 1, 2$  (genotipos o tratamientos)

$n = 1, 2, 3, \dots, N$  (moscas)

$\epsilon =$  error del ajuste

El código de significancia mostrado en las figuras se detalla a continuación:

x p-value < 0.1  
\* p-value < 0.05  
\*\* p-value < 0.01  
\*\*\* p-value < 0.001  
s.d p-value > 0.1

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Efectos de la estimulación optogenética sobre genotipos controles

Para discriminar el efecto propio del genotipo en el ritmo locomotor, el efecto de la estimulación lumínica sobre cada control (Gal y UAS) y el efecto del retinal sobre la sensibilidad a dicha estimulación, se llevaron a cabo experimentos controles tanto para la línea *R18H11-Gal4>+* como para la línea *UAS-Chrimson>+*.

Las figuras 8 y 10 muestran los resultados obtenidos para las moscas control *R18H11-Gal4>+*. Es considerable el efecto de este genotipo sobre el ritmo locomotor, ya que se observa claramente en el actograma que esta línea transgénica posee picos de actividad E corridos hacia la derecha (hacia la noche) (figura 8A, observar las flechas) en comparación con los esperados para machos con comportamiento locomotor normal, donde en general se observan dos picos de actividad uno a la mañana y otro a la tarde que anticipan las transiciones de luz-oscuridad separados por un período de inactividad (figura 3A).

También es claro que en el día de estimulación (día 2) el pico E es mayor al día base (día 1) y a los días de recuperación (días 3 y 4) (figura 8A, observar las flechas). Se puede observar en el sueñoograma que las moscas alimentadas con retinal perdieron más sueño nocturno durante la estimulación con luz roja que las demás moscas (figura 8B, observar flechas). El plot de substracción (figura 10A) muestra que la pérdida de sueño del día LED respecto al día base es notable de ZT 12 a ZT 24. Sin embargo, el fold change en sueño no cambió significativamente el día LED respecto al día base ( $t = -0.6506$ ,  $p\text{-value} = 0.5198$ ) (figura 10B). La pérdida de sueño durante las horas de estimulación observada tanto en el plot de substracción (figura 10A) como en el sueñoograma (figura 8B, observar flechas), así como el aumento de actividad locomotora (figura 8A, observar el pico E del día 2 respecto a los demás) es una clara respuesta de alerta o *startle* debido al intenso parpadeo lumínico percibido por todas las moscas.

Respecto al control *UAS-Chrimson>+*, no hay efecto del genotipo en el patrón locomotor. Se observa tanto en el actograma como en el sueñoograma (figura 9A-B) un patrón locomotor típico de machos de *D. melanogaster*. Excepto por el día de estimulación, es posible ver claramente los picos agudos de actividad M y E, con un sueño diurno y sueño nocturno consistente a lo largo de los días. En el día LED se evidencia un efecto de la alimentación con retinal en la sensibilidad a la luz, ya que las moscas con dicha alimentación muestran mayor actividad y menor sueño durante las horas de la noche; clara respuesta *startle* (figura 9A-B, observar las flechas). Aunque las moscas que no fueron alimentadas con retinal parecen no ser muy afectadas durante las horas de estimulación (figura 9A-B, día 3 línea negra), en el substracción plot se observa una pérdida de sueño importante respecto al día base en las primeras horas de la noche para ambos tratamientos (figura 11A, observar la flecha). La diferencias entre ambos tratamientos en el efecto de la luz roja se aprecian mejor en el fold change de sueño, donde las moscas alimentadas con retinal perdieron significativamente más sueño que las controles en el día LED que en el día base ( $t = 2.9927$ ,  $p\text{-value} = 0.004103$ ) (figura 11B).

En resumen, ambos controles muestran una respuesta *startle* que se intensifica más aún con el agregado de retinal a la comida. Esto es esperable, ya que las moscas pueden ver la luz roja a altas intensidades como las que se usan en estos experimentos (Sharkey et al., 2020) (figura 6B). Aunque el uso del retinal aumenta más la sensibilidad de las moscas a la luz roja, es necesario su uso para los experimentos donde se exprese *CsChrimson* ya que es un cofactor necesario para la apertura de este canal iónico foto-sensible (Wald, 1968). Como la línea *UAS-Chrimson>+* muestra un mejor ritmo locomotor general (comparar actogramas figura 8A con figura 9A) se usó como línea control en todos los experimentos mostrados a continuación.

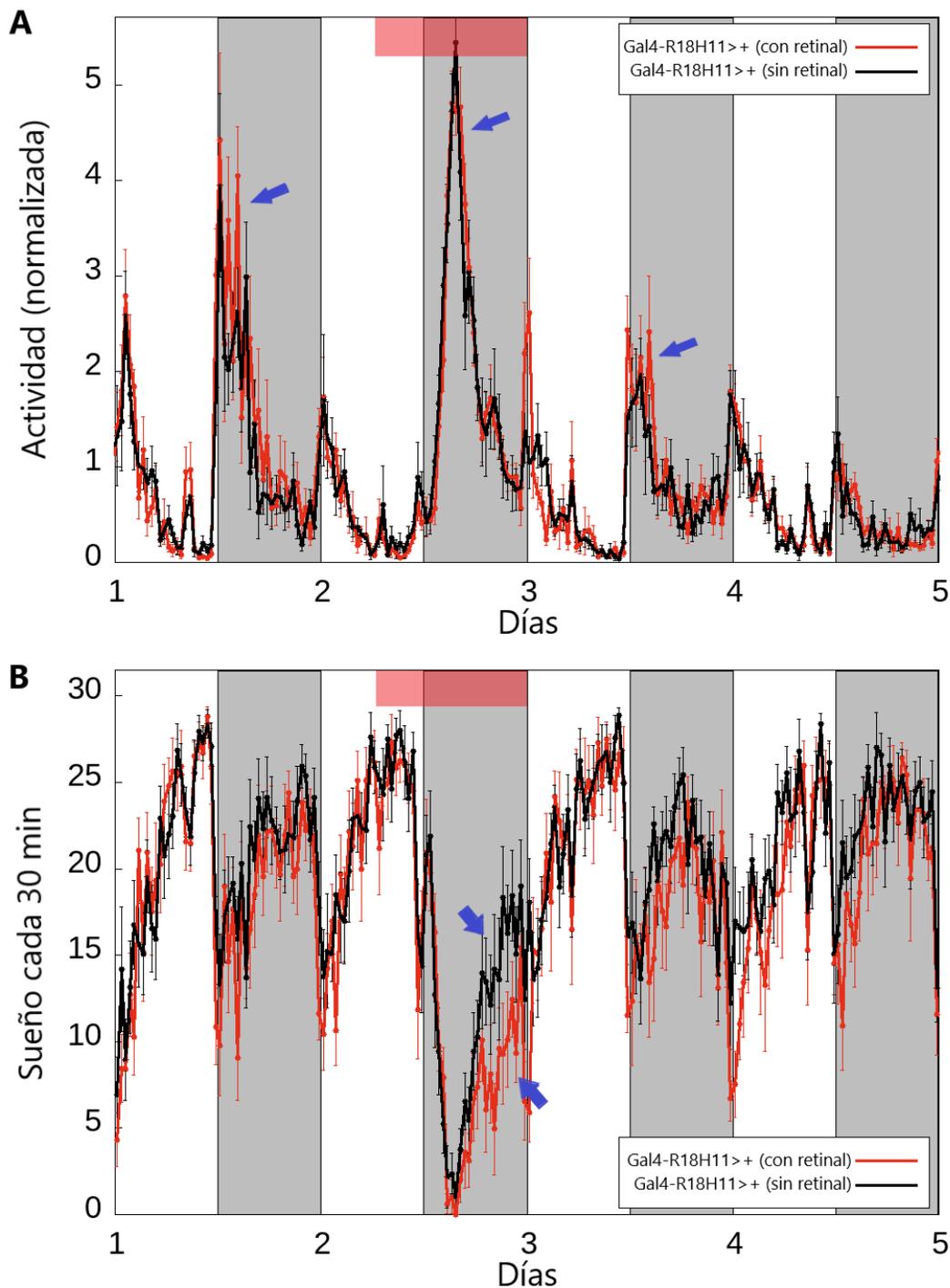


Figura 8: *Control R18H11-Gal4>+ con y sin retinal* **A.** Actograma: actividad locomotora normalizada en machos (ecuación 1). En negro la actividad para el control *R18H11-Gal4>+* sin retinal (N = 13) y en rojo con retinal (N = 14). La transición entre el día y la noche (LO) se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente (ZT 0 = 8 AM, ZT 12 = 8 PM). La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs (ZT 7 - 24). **B.** Sueñograma: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora. En negro el sueño para el control *R18H11-Gal4>+* sin retinal y en rojo con retinal. La transición LO se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente. La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs. Repeticiones del experimento = 2.

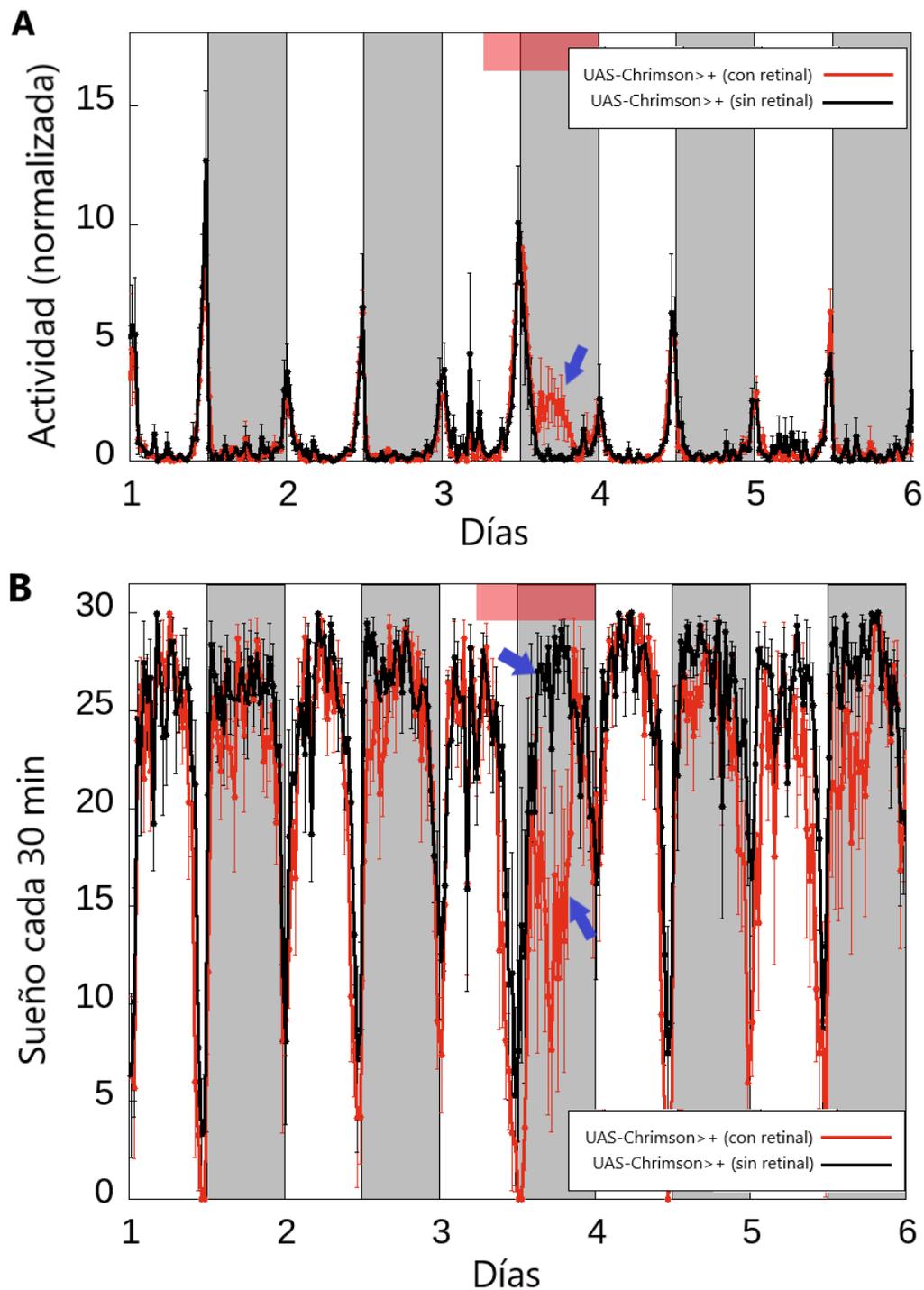


Figura 9: *Control UAS-Chrimson>+ con y sin retinal* **A.** Actograma: actividad locomotora normalizada en machos (ecuación 1). En negro la actividad para el control UAS-Chrimson sin retinal ( $N = 6$ ) y en rojo con retinal ( $N = 6$ ). La transición entre el día y la noche (LO) se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente (ZT 0 = 8 AM, ZT 12 = 8 PM). La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs (ZT 7 - 24). **B.** Sueñograma: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora. En negro el sueño para el control UAS-Chrimson sin retinal y en rojo con retinal. La transición LO se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente. La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs. Repeticiones del experimento = 1.

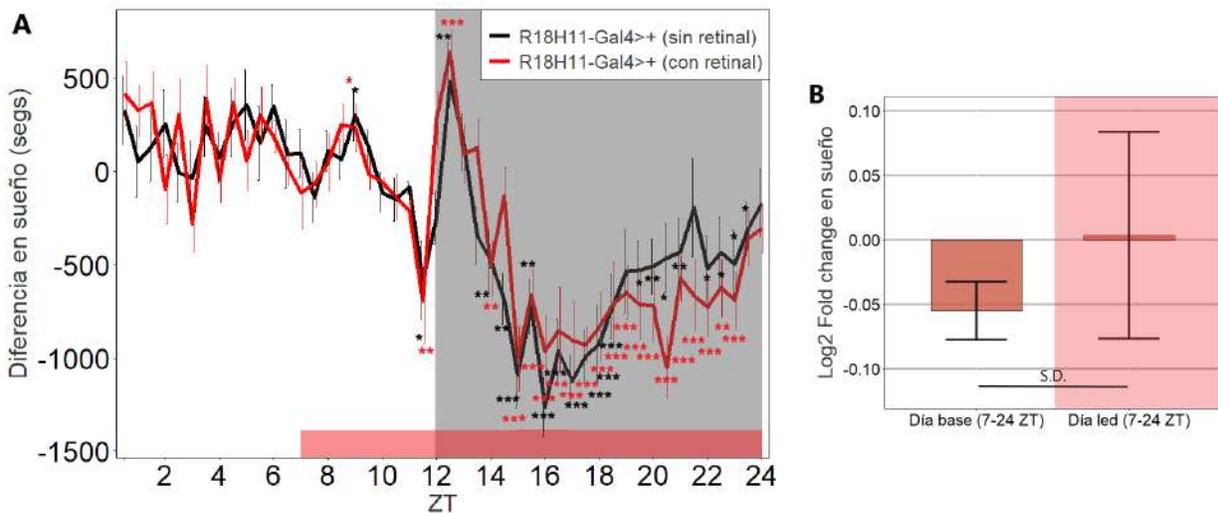


Figura 10: *Control R18H11-Gal4>+ con y sin retinal* **A.** Plot de substracción (ecuación 2), las barras indican  $\pm 1$  sd, día base: día 1. La barra blanca y gris representan las horas de luz-oscuridad respectivamente y la barra roja horizontal muestra las horas de estimulación con LEDs. Contrastes bin a bin para las moscas *R18H11-Gal4>+* con retinal ( $N = 14$ ) y sin retinal ( $N = 13$ ) muestran si la diferencia *día estimulación* – *día base* es significativa. **B.** Fold change en sueño de las moscas tratadas respecto al control (ecuación 3). Las barras corresponden a  $\pm 1$  SE. Día base: día 1. Se realizó un test t pareado con corrección de welsh para cada bin ( $t = -0.6506$ ,  $df = 33$ ,  $p$ -value =  $0.5198$ ). Repeticiones del experimento = 2.

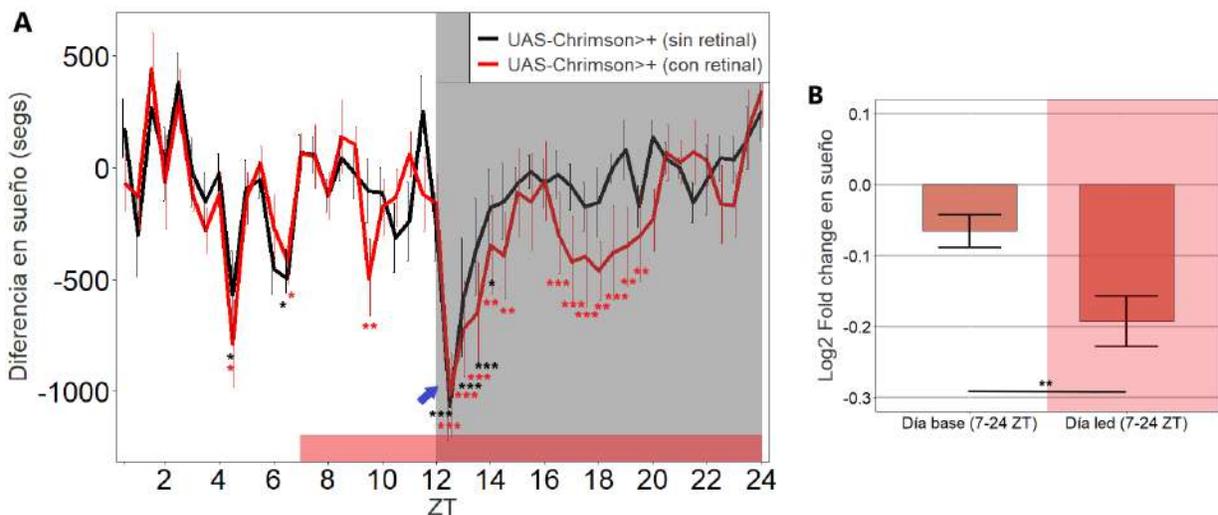


Figura 11: *Control UAS-Chrimson>+ con y sin retinal* **A.** Plot de substracción (ecuación 2), las barras indican  $\pm 1$  sd, día base: día 2. La barra blanca y gris representan las horas de luz-oscuridad respectivamente y la barra roja horizontal muestra las horas de estimulación con LEDs. Contrastes bin a bin para las moscas *UAS-Chrimson>+* con retinal ( $N = 6$ ) y sin retinal ( $N = 6$ ) muestran si la diferencia *día estimulación* – *día base* es significativa. **B.** Fold change en sueño de las moscas tratadas respecto al control (ecuación 3). Las barras corresponden a  $\pm 1$  SE. Día base: día 2. Se realizó un test t pareado para cada bin ( $t = 2.9927$ ,  $df = 56.189$ ,  $p$ -value =  $0.004103$ ). Repeticiones del experimento = 1.

## 4.2. Activación de las neuronas DN1ps

Múltiples líneas de evidencia muestran que las neuronas relojeras DN1ps funcionan como neuronas promotoras de actividad que contribuyen a aumentar la actividad locomotora antes del encendido y apagado de las luces en condiciones de luz-oscuridad (LO) (Zhang et al., 2010b; Cavanaugh et al., 2014; Kunst et al., 2014). Más aún, recientemente se ha descrito que un subgrupo de neuronas DN1p pueden promover el sueño diurno a través de un circuito de retroalimentación negativa (Guo et al., 2016). Guo y colaboradores mostraron que un subgrupo de neuronas glutamatérgicas DN1p marcadas por el promotor R18H11 son activadas por las neuronas PDF durante la mañana, lo que luego provoca la inhibición de las células E y M generando el período de inactividad o siesta. Teniendo en cuenta estos resultados, en este trabajo evaluamos la utilidad de nuestro dispositivo repitiendo el experimento mostrado Guo et al. (2016) (figura 5A-B)

La activación de las neuronas DN1ps no produjo el resultado esperado; la supresión del pico E. Tanto en el actograma y como en el sueñoograma (figura 12A-B) no se observa la pérdida de actividad o la siesta extendida buscada (observar en la figura 12A que el pico E del día 3 está presente). Por el contrario, ambos genotipos responden con reducción de la cantidad de sueño durante casi toda la noche del día de estimulación LED respecto del día base (figura 14A). Sin embargo, el actograma muestra que el aumento de actividad locomotora y la pérdida de sueño durante la estimulación es mayor en el genotipo control que en las moscas que expresan Chrimson (figura 12A-B, observar las flechas). Además, el fold change del sueño de *R18H11-Gal4>Chrimson* respecto a su control *UAS-Chrimson>+* muestra una mayor cantidad de sueño para el genotipo tratado que se acentúa aún más en el día LED (figura 14B). Las diferencias entre dichos días están muy cerca de la significancia ( $t = -2.0001$ ,  $p\text{-value} = 0.05378$ ) por lo que se infiere que la estimulación con luz roja en las moscas *R18H11-Gal4>Chrimson* genera dos efectos en contraposición; el efecto de alerta o *startle* claramente observado en los controles como una respuesta homeostática al estrés producido por la luz, y el efecto “adormecedor” del marcapasos central dado por la activación de las DN1ps. En las moscas controles, no habría un accionar de estas neuronas circadianas por lo que el efecto *startle* es más visible y genera una mayor pérdida de sueño (figura 12B, noche del día 3 línea negra). La mayor cantidad de sueño de las moscas *R18H11-Gal4>Chrimson* en el día base respecto al control (figura 14B, barra izquierda) podría ser explicado por la activación de los canales Chrimson debido la luz blanca.

Debido al posible efecto de la luz blanca sobre la activación de los canales chrimson, se procedió a realizar el mismo experimento anterior pero en este caso, la manipulación de la moscas (cruzamientos y selección de moscas) se hizo bajo luz roja tenue y el experimento se realizó en completa oscuridad. Es esperable por lo tanto, observar más claramente el efecto de la apertura de los canales en el genotipo tratado. Sin embargo, también es esperable que no sea posible librarse del efecto *startle* tanto para tratadas como para controles, provocado por el encendido súbito de la luz.

De acuerdo a estas predicciones, en las figuras 13A y 13B se puede observar claramente el aumento de actividad y la reducción en el sueño de las moscas controles durante las horas de estimulación LED (día 3, línea negra, observar las flechas). Dicho efecto no es evidente para el genotipo *R18H11-Gal4>Chrimson* (día 3, línea roja, observar las flechas). El plot de substracción muestra que el genotipo tratado casi no pierde sueño nocturno respecto del día base, como si ocurre con el control (figura 15A). Esta diferencia de respuesta al estímulo lumínico, es apoyada también por el fold change del sueño, que nuevamente y de manera consistente con el experimento anterior, es mayor e inclusive más significativo para el día de estimulación que para el día base ( $t = -2.9391$ ,  $p\text{-value} = 0.005969$ ) (figura 15B).

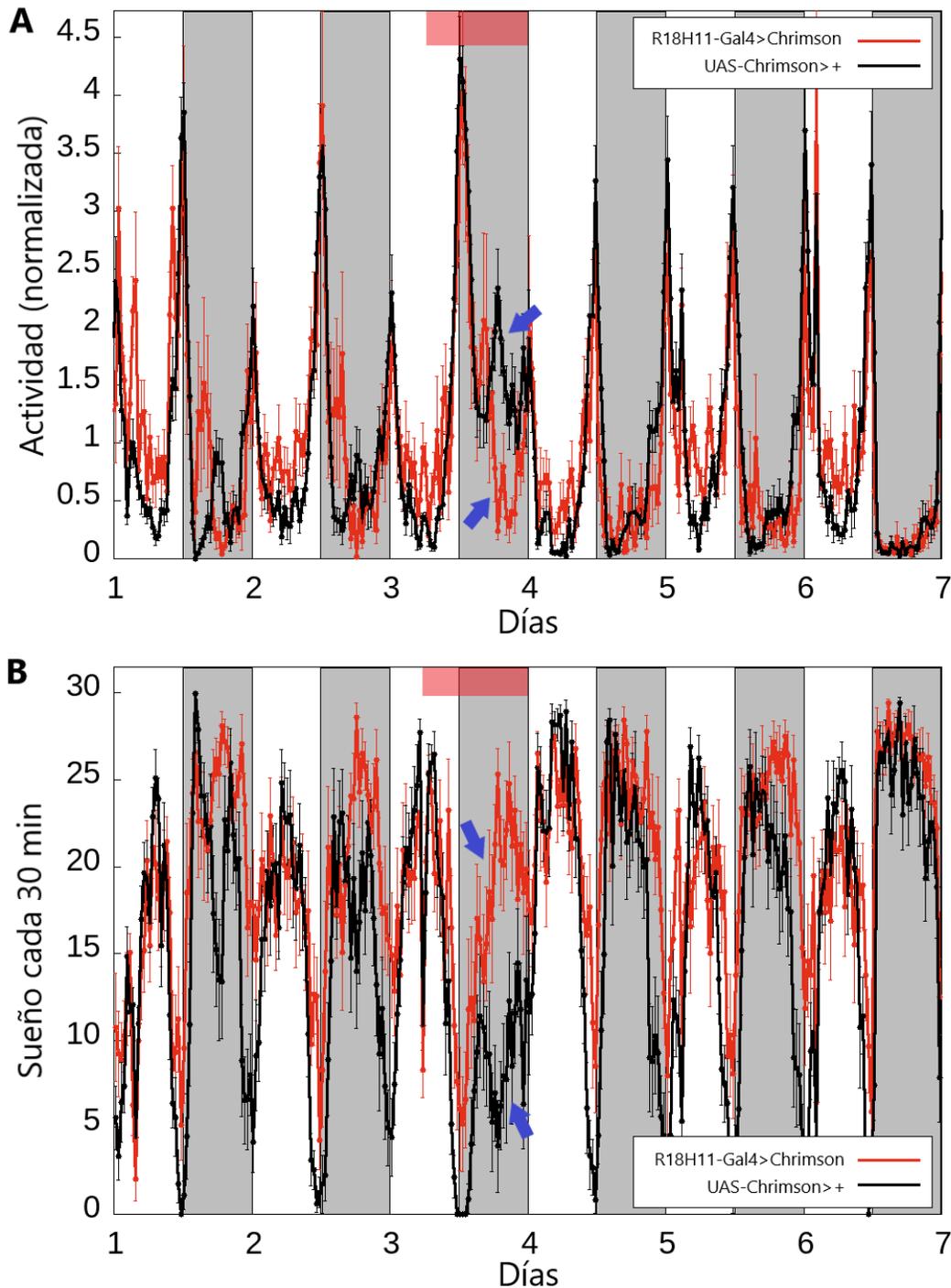


Figura 12: *R18H11-Gal4*>*Chrimson* en LO **A.** Actograma: actividad locomotora normalizada en machos (ecuación 1). En negro la actividad para el control *UAS-Chrimson*>+ (N = 13) y en rojo para el genotipo “tratamiento” *R18H11-Gal4*>*Chrimson* (N = 12). La transición entre el día y la noche (LO) se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente (ZT 0 = 8 AM, ZT 12 = 8 PM). La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs (ZT 7 - 24). **B.** Sueñograma: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora. En negro el sueño para el *UAS-Chrimson*>+ y en rojo para *R18H11-Gal4*>*Chrimson*. La transición LO se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente. La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs. Repeticiones del experimento = 2.

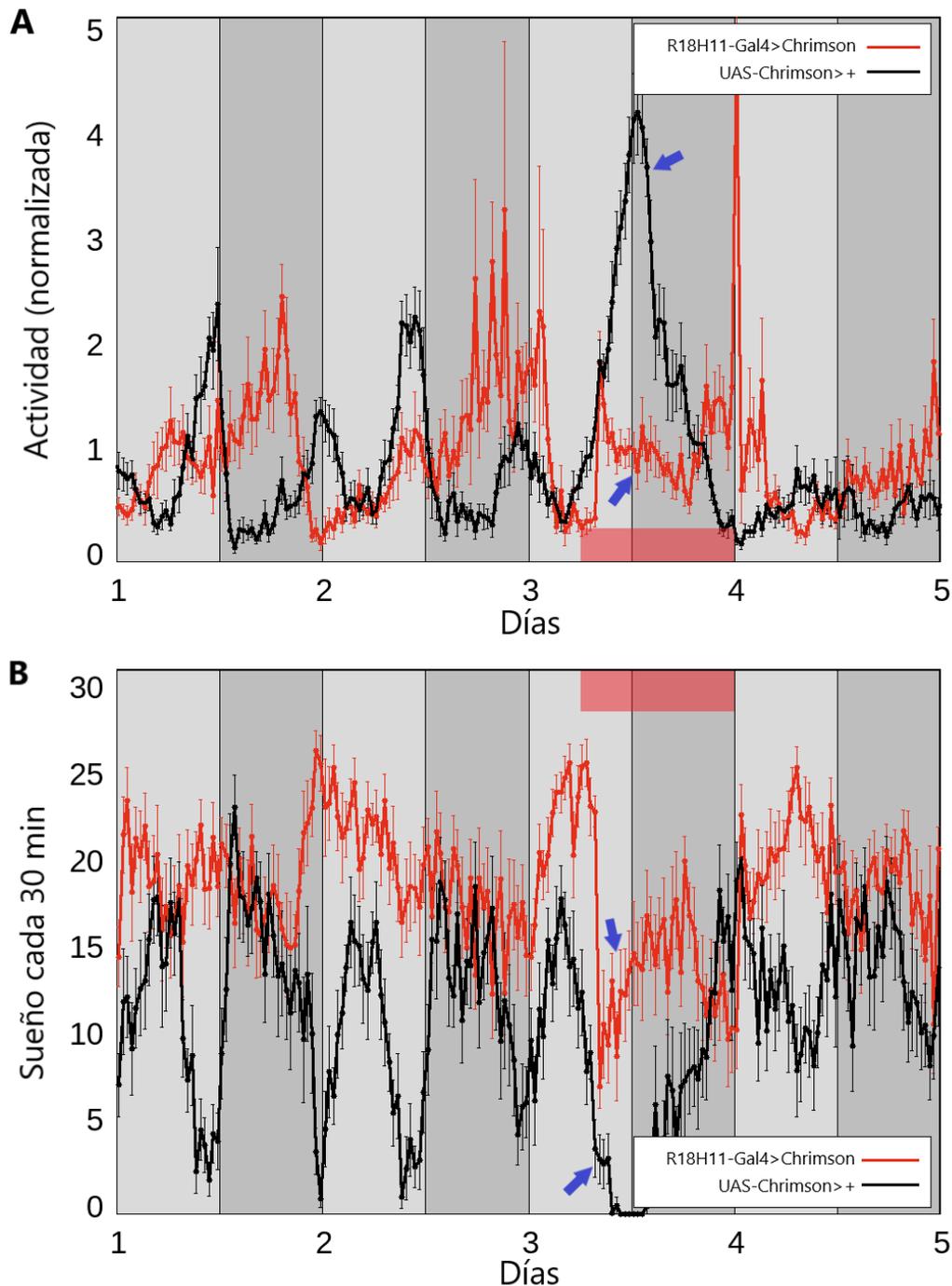


Figura 13: *R18H11-Gal4>Chrimson* en OO **A.** Actograma: actividad locomotora normalizada en machos (ecuación 1). En negro la actividad para el control *UAS-Chrimson>+* (N = 13) y en rojo para el genotipo "tratamiento" *R18H11-Gal4>Chrimson* (N = 12). La transición entre el día y la noche subjetiva (OO) se muestra con las barras grises claras y oscuras correspondientemente (ZT 0 = 8 AM, ZT 12 = 8 PM). La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs (ZT 7 - 24). **B.** Sueñograma: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora. En negro el sueño para el control *UAS-Chrimson>+* y en rojo para *R18H11-Gal4>Chrimson*. La transición entre día y noche subjetiva (OO) se muestra con las barras grises claras y oscuras correspondientemente. La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs. Repeticiones del experimento = 1.

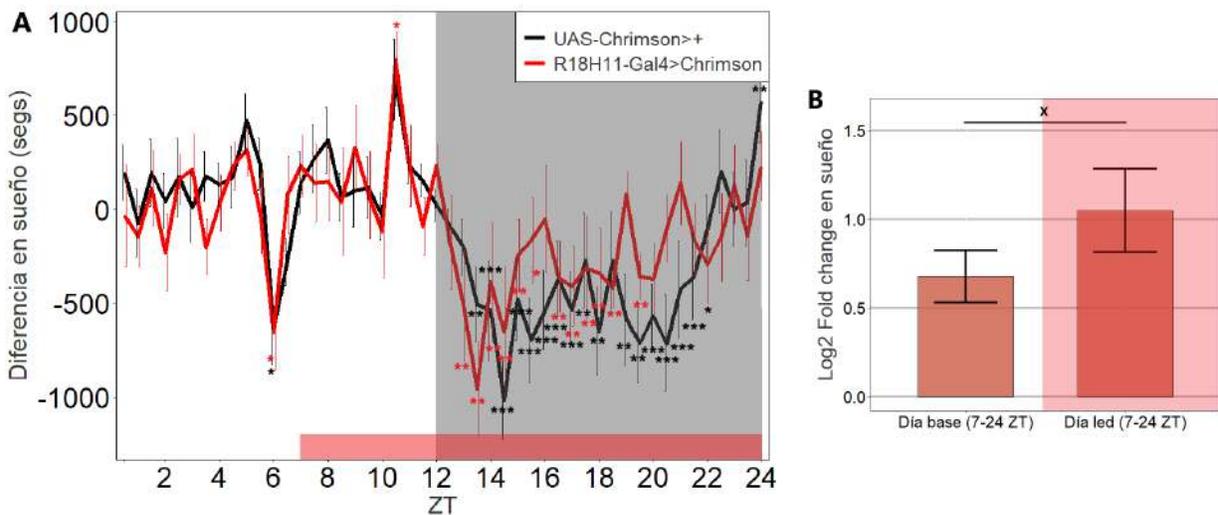


Figura 14: *R18H11-Gal4>Chrimson* en LO **A.** Plot de substracción (ecuación 2), las barras indican  $\pm 1$  sd, día base: día 2. La barra blanca y gris representan las horas de luz-oscuridad respectivamente y la barra roja horizontal muestra las horas de estimulación con LEDs. Contrastes bin a bin para los genotipos *R18H11-Gal4>Chrimson* (N = 13) y *UAS-Chrimson>+* (N = 12) muestran si la diferencia *día estimulación* – *día base* es significativa. **B.** Fold change en sueño de las moscas tratadas respecto al control (ecuación 3). Las barras corresponden a  $\pm 1$  SE. Día base: día 2. Se realizó un test t pareado para cada bin ( $t = -2.0001$ ,  $df = 33$ ,  $p\text{-value} = 0.05378$ ). Repeticiones del experimento = 2.

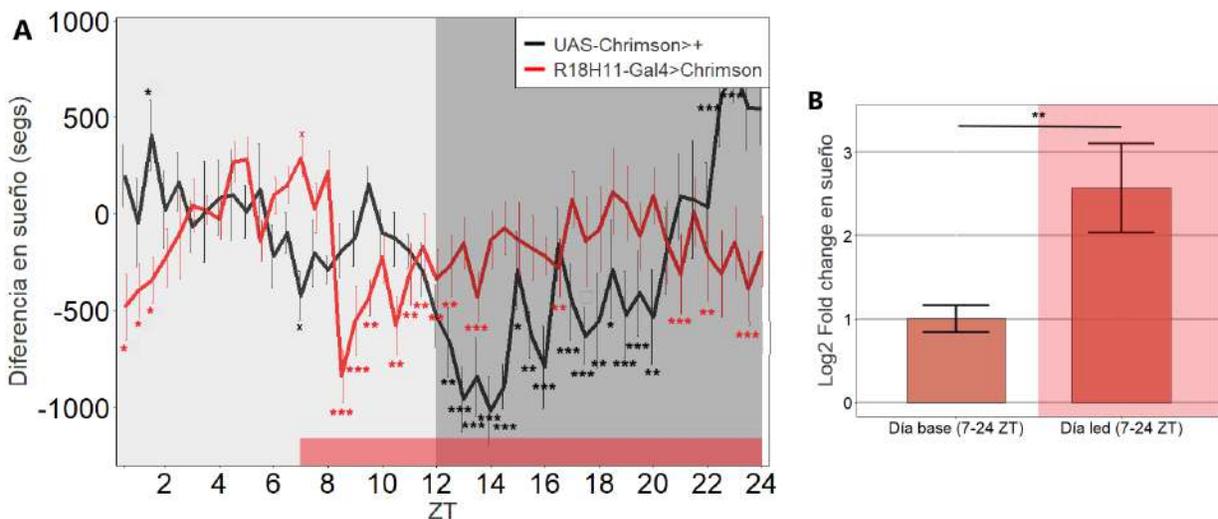


Figura 15: *R18H11-Gal4>Chrimson* en OO **A.** Plot de substracción (ecuación 2), las barras indican  $\pm 1$  sd, día base: día 2. La barra gris clara y gris oscura representan las horas de día-noche subjetiva respectivamente y la barra roja horizontal muestra las horas de estimulación con LEDs. Contrastes bin a bin para los genotipos *R18H11-Gal4>Chrimson* (N = 12) y *UAS-Chrimson>+* (N = 13) muestran si la diferencia *día estimulación* – *día base* es significativa. **B.** Fold change en sueño de las moscas tratadas respecto al control (ecuación 3). Las barras corresponden a  $\pm 1$  SE. Día base: día 2. Se realizó un test t pareado para cada bin ( $t = -2.9391$ ,  $df = 33$ ,  $p\text{-value} = 0.005969$ ). Repeticiones del experimento = 1.

La mayor cantidad de sueño de las moscas *R18H11-Gal4>Chrimson* respecto a los controles *UAS-Chrimson>+* en el día base puede ser explicado en este caso por la diferencia de fase y periodo en el patrón locomotor entre dichos genotipos. El resultado de este experimento es consistente con el anterior; la luz provoca un efecto *startle* que es evidente en las moscas *UAS-Chrimson>+*, pero que se ve atenuado en las *R18H11-Gal4>Chrimson* por la activación de las neuronas DN1p.

Para el mismo tiempo ZT 7-24, los genotipos no muestran un comportamiento sincronizado y esto es debido a la falta de luz como clave ambiental para la sincronización de los osciladores circadianos. Es evidente que la actividad del genotipo tratado es prácticamente unimodal (figura 13A-B línea roja), a diferencia de una relativa buena sincronización de los controles a la transición día-noche subjetiva (con los picos M y E, siesta y sueño nocturno) al menos, para los primeros dos días (figura 13A-B línea negra)

#### 4.2.1. Activación de las DN1ps restringida al periodo de luz

Debido a la importante respuesta *startle* en la noche de estimulación por parte de todas las moscas que imposibilita la discriminación clara entre el efecto propio de la luz y el del disparo de las DN1ps glutamatérgicas, se procedió a limitar el estímulo lumínico a solo durante las horas de luz, donde la respuesta de alerta por parte de las moscas es más reducida.

La estimulación por 5 hs durante la fase lumínica del día (ZT 7 - 12) produjo una reducción del pico E en el genotipo *R18H11-Gal4>Chrimson* no observado en los controles (figura 16A, observar flechas día 5). Sin embargo, esta reducción en la actividad no implicó un aumento de sueño considerable, ya que no se puede apreciar en el sueñoograma diferencias notables en el sueño entre el día de estimulación y los demás días (figura 16B). El genotipo tratado también muestra cierto desplazamiento del pico E hacia la noche (observar flechas en los picos E día 2, 3 y 4) a diferencia del patrón normal del control, siendo consecuente con el efecto del genotipo sobre el patrón locomotor observado en los controles *R18H11-Gal4>+* (figura 8A-B). En el plot de substracción se observa que las moscas *R18H11-Gal4>Chrimson* durmieron más respecto al día base en algunos bins en las horas posteriores a la estimulación (figura 18A, flechas sobre línea roja). Las moscas controles por otra parte, muestran una pérdida de sueño durante las primeras horas de la noche, lo que se interpreta como una respuesta *startle* (figura 18B, flecha sobre línea negra). El fold change del sueño de las tratadas respecto a los controles, muestra cierta tendencia hacia el aumento de la cantidad de sueño con la estimulación LED ( $t = -1.6005$ ,  $p\text{-value} = 0.119$ ) respecto del día base (figura 18B). En conjunto, estos análisis muestran que la activación ZT 7 - 12 de las DN1ps reduce la actividad y aumenta ligeramente el sueño de las moscas que expresan *Chrimson*. Por otra parte, en los controles aún se observa cierto efecto *startle* no durante la estimulación, pero si durante las primeras horas de la noche, aunque después su sueño se normaliza (figura 18B, línea negra)

Cuando se repite el experimento anterior en completa oscuridad, las diferencias del fold change en sueño entre controles y tratadas aumenta de manera significativa ( $t = -4.0302$ ,  $p\text{-value} = 0.0003088$ ) (figura 19B). Se logró provocar un leve aumento de sueño en las moscas *R18H11-Gal4>Chrimson* durante la estimulación (figura 19A, flechas sobre línea roja) pero también una respuesta *startle* mayor en el genotipo control que aumentó más la pérdida de sueño nocturno en éstas, como se ve en el sueñoograma y en el plot de substracción (figura 17B y 19A, flechas sobre línea negra). Es llamativo que esta respuesta homeostática también se vea retrasada como en el experimento anterior, ya que ocurre luego de las horas de estimulación y no durante el estímulo (figura 19A, flecha sobre línea negra).

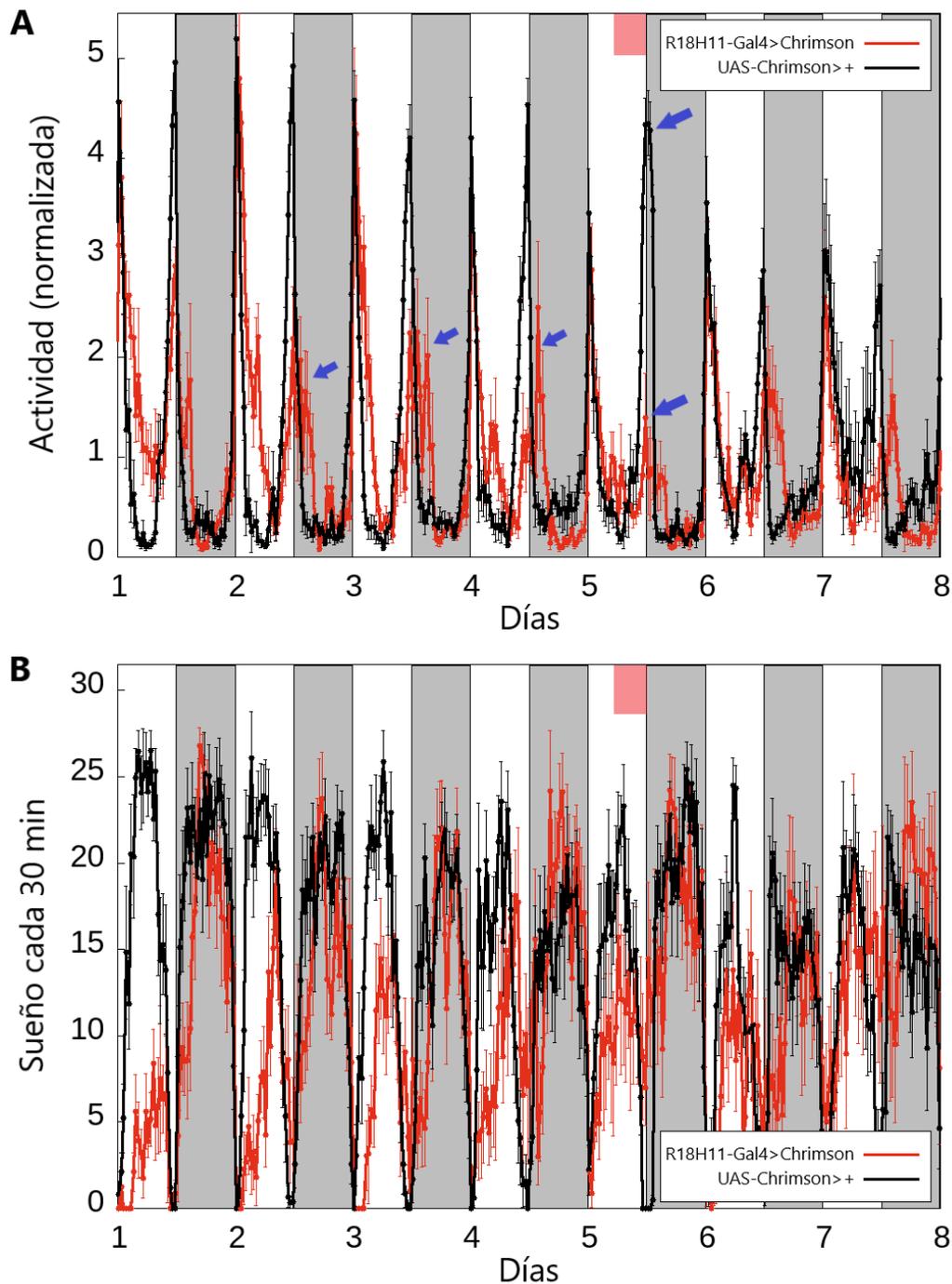


Figura 16: *R18H11-Gal4 > Chromson* en LO **A**. Actograma: actividad locomotora normalizada en machos (ecuación 1). En negro la actividad para el control *UAS-Chrimson > +* (N = 11) y en rojo para el genotipo "tratamiento" *R18H11-Gal4 > Chromson* (N = 8). La transición entre el día y la noche (LO) se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente (ZT 0 = 8 AM, ZT 12 = 8 PM). La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs (ZT 7 - 12). **B**. Sueñograma: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora. En negro el sueño para el control *UAS-Chrimson > +* y en rojo para *R18H11-Gal4 > Chromson*. La transición LO se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente. La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs. Repeticiones del experimento = 1.

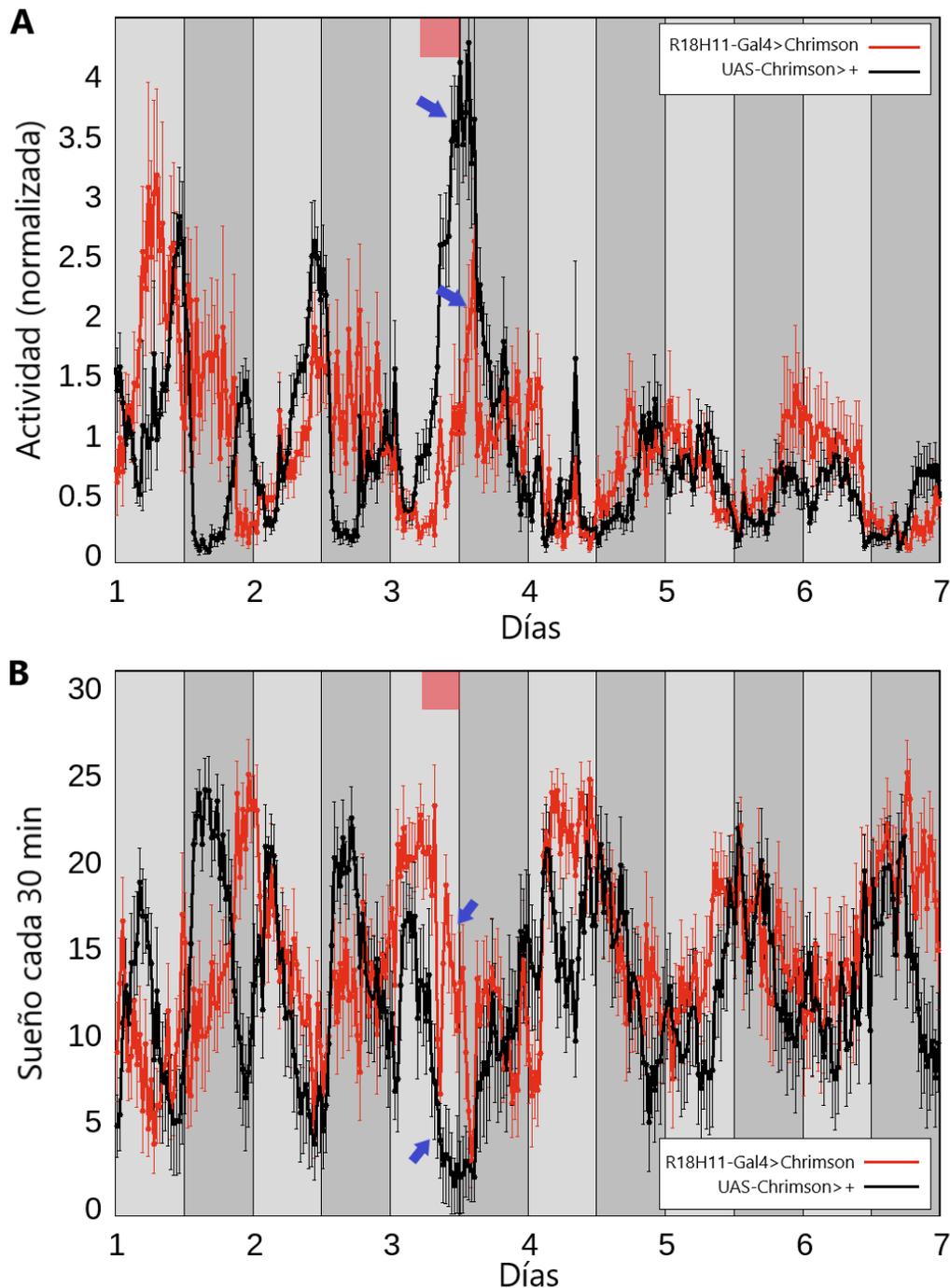


Figura 17: *R18H11-Gal4>Chrimson* en OO **A.** Actograma: actividad locomotora normalizada en machos (ecuación 1). En negro la actividad para el control *UAS-Chrimson>+* (N = 12) y en rojo para el genotipo "tratamiento" *R18H11>Chrimson* (N = 12). La transición entre el día y la noche subjetiva (OO) se muestra con las barras grises claras y oscuras correspondientemente (ZT 0 = 8 AM, ZT 12 = 8 PM). La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs (ZT 7 - 12). **B.** Sueñograma: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora. En negro el sueño para el control *UAS-Chrimson>+* y en rojo para *R18H11-Gal4>Chrimson*. La transición entre día y noche subjetiva (OO) se muestra con las barras grises claras y oscuras correspondientemente. La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs. Repeticiones del experimento = 1.

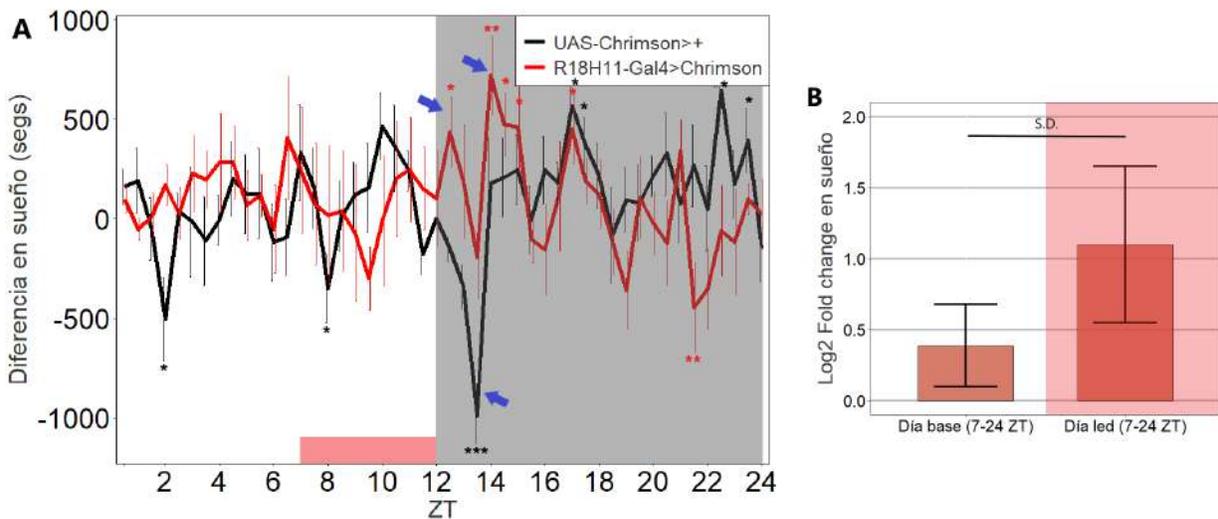


Figura 18: *R18H11-Gal4>Chrimson* en LO **A.** Plot de substracción (ecuación 2), las barras indican  $\pm 1$  sd, día base: día 4. La barra blanca y gris representan las horas de luz-oscuridad respectivamente y la barra roja horizontal muestra las horas de estimulación con LEDs. Contrastes bin a bin para los genotipos *R18H11-Gal4>Chrimson* (N = 8) y *UAS-Chrimson>+* (N = 11) muestran si la diferencia *día estimulación* – *día base* es significativa. **B.** Fold change en sueño de las moscas tratadas respecto al control (ecuación 3). Las barras corresponden a  $\pm 1$  SE. Día base: día 4. Se realizó un test t pareado para cada bin ( $t = -1.6005$ ,  $df = 33$ ,  $p\text{-value} = 0.119$ ). Repeticiones del experimento = 1.

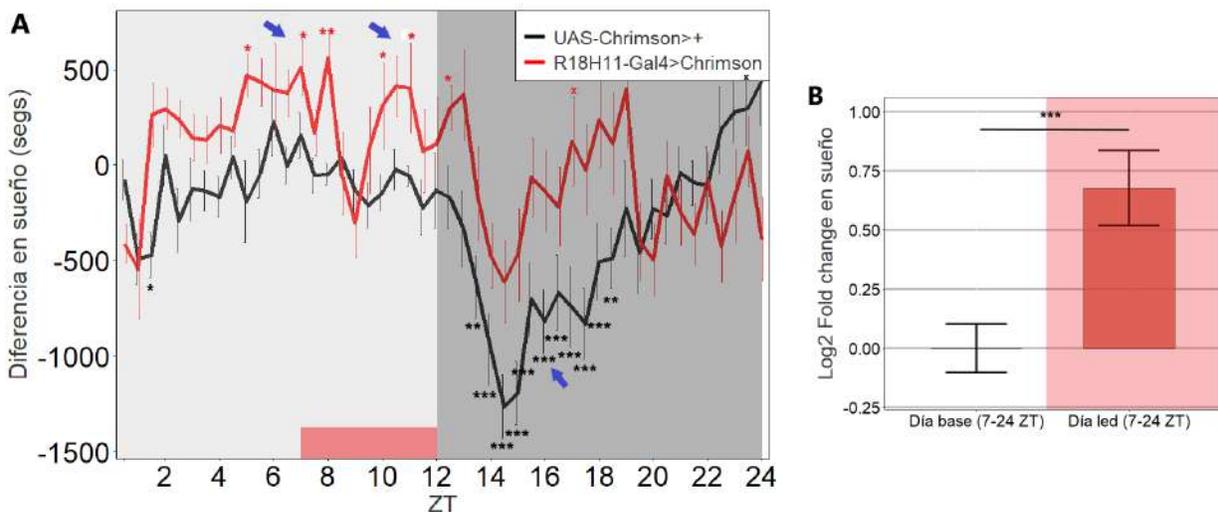


Figura 19: *R18H11-Gal4>Chrimson* en OO **A.** Plot de substracción (ecuación 2), las barras indican  $\pm 1$  sd, día base: día 2. La barra gris clara y gris oscura representan las horas de día-noche subjetiva y la barra roja horizontal muestra las horas de estimulación con LEDs. Contrastes bin a bin para los genotipos *R18H11-Gal4>Chrimson* (N = 12) y *UAS-Chrimson>+* (N = 12) muestran si la diferencia *día estimulación* – *día base* es significativa. **B.** Fold change en sueño de las moscas tratadas respecto al control (ecuación 3). Las barras corresponden a  $\pm 1$  SE. Día base: día 2. Se realizó un test t pareado para cada bin ( $t = -4.0302$ ,  $df = 33$ ,  $p\text{-value} = 0.0003088$ ). Repeticiones del experimento = 1.

El genotipo *R18H11-Gal4>Chrimson*, al igual que todos los experimentos anteriores, no muestra un efecto *startle* tan importante como en los controles, sino que pareciera mantenerse inerte al estímulo lumínico ya que no aumenta su actividad locomotora como si lo hacen los controles (figura 17A, observar las flechas). Esta consistencia de respuesta refuerza la idea de que existen dos efectos contrapuestos ocurriendo en estas moscas; la activación de las DN1ps induciendo el sueño y la respuesta homeostática de alerta induciendo actividad. Por último, tanto el actograma como el sueñoograma (figura 17A-B) muestran una ritmicidad locomotora pobre para ambos genotipos, lo cual es esperable debido a que fueron privadas de claves lumínicas durante todo su desarrollo adulto.

#### 4.2.2. Activación de las DN1ps en hembras

Como se ha discutido, los resultados obtenidos condicionan fuertemente el uso de la estimulación lumínica solo durante las horas de luz. De esta manera, se busca reducir la respuesta *startle* que se mezcla con la respuesta a la luz roja y dificulta ver con claridad el efecto específico de la activación neuronal. Una hipótesis a probar dentro de esta limitación, se encuentra en el dimorfismo sexual descrito por Guo et al. (2016) en la activación de las DN1ps glutamatérgicas. En este trabajo, se mostró un perfil diario unimodal de actividad de estas neuronas, las cuales están más activas durante la mañana en machos y durante la noche en hembras (figura 5D-E). Es sabido que dicha actividad neuronal matutina es responsable de la siesta en machos. Sin embargo, Guo y colaboradores no discriminaron entre el estado reproductivo de las hembras, por lo que no quedó completamente establecido aún si esta actividad dimórfica se trata efectivamente de un dimorfismo sexual o un efecto post-cópula.

Para responder esta pregunta, se activaron estas neuronas durante la mañana (ZT 0 - 5) en hembras vírgenes y hembras apareadas en un intento por simular la actividad de las DN1ps correspondiente a machos, y así discriminar su efecto según los estados reproductivos de las hembras. Se espera que si se trata de un efecto post-cópula, la activación matutina de estas neuronas en hembras apareadas restablezca un sueño diurno más parecido al de los machos, mientras que en hembras vírgenes no se debería observar ningún cambio, ya que el patrón de actividad locomotora de estas últimas es similar al de los machos (figura 3A línea naranja). Por otro lado, si existe un dimorfismo sexual en el patrón de disparo diario de estas neuronas (a pesar de que el patrón locomotor sea similar entre sexos) su activación matutina debería provocar algún efecto en la actividad locomotora y/o sueño diurno también en las hembras vírgenes, presumiblemente, aumentar aún más el sueño diurno (bajo la suposición de que no hay dimorfismo sexual en la función “adormecedora” de las DN1ps glutamatérgicas).

En los actogramas de la figura 20 se observan cambios sustanciales en la actividad a través de los días para ambos genotipos y ambos estados reproductivos. Es notable la tendencia de la actividad a disminuir con los días en ambos estados reproductivos y en especial en hembras vírgenes (figura 20A-B). Dentro de esta reducción en la actividad locomotora en general de todas las moscas, es notable especialmente la pérdida del pico E de las moscas *R18H11-Gal4>Chrimson* para ambos estados reproductivos el día de estimulación (día 2) lo cual no ocurrió en los controles (figura 20A-B, observar flechas). Estos efectos también ya se observan de manera más tímida en el día base y sobre todo en hembras vírgenes (figura 20A, observar flecha sobre pico E día 1), lo cual indicaría un efecto base sobre las moscas *R18H11-Gal4>Chrimson*, en las cuales ya existe cierta actividad de las DN1ps debido a la estimulación por luz blanca.

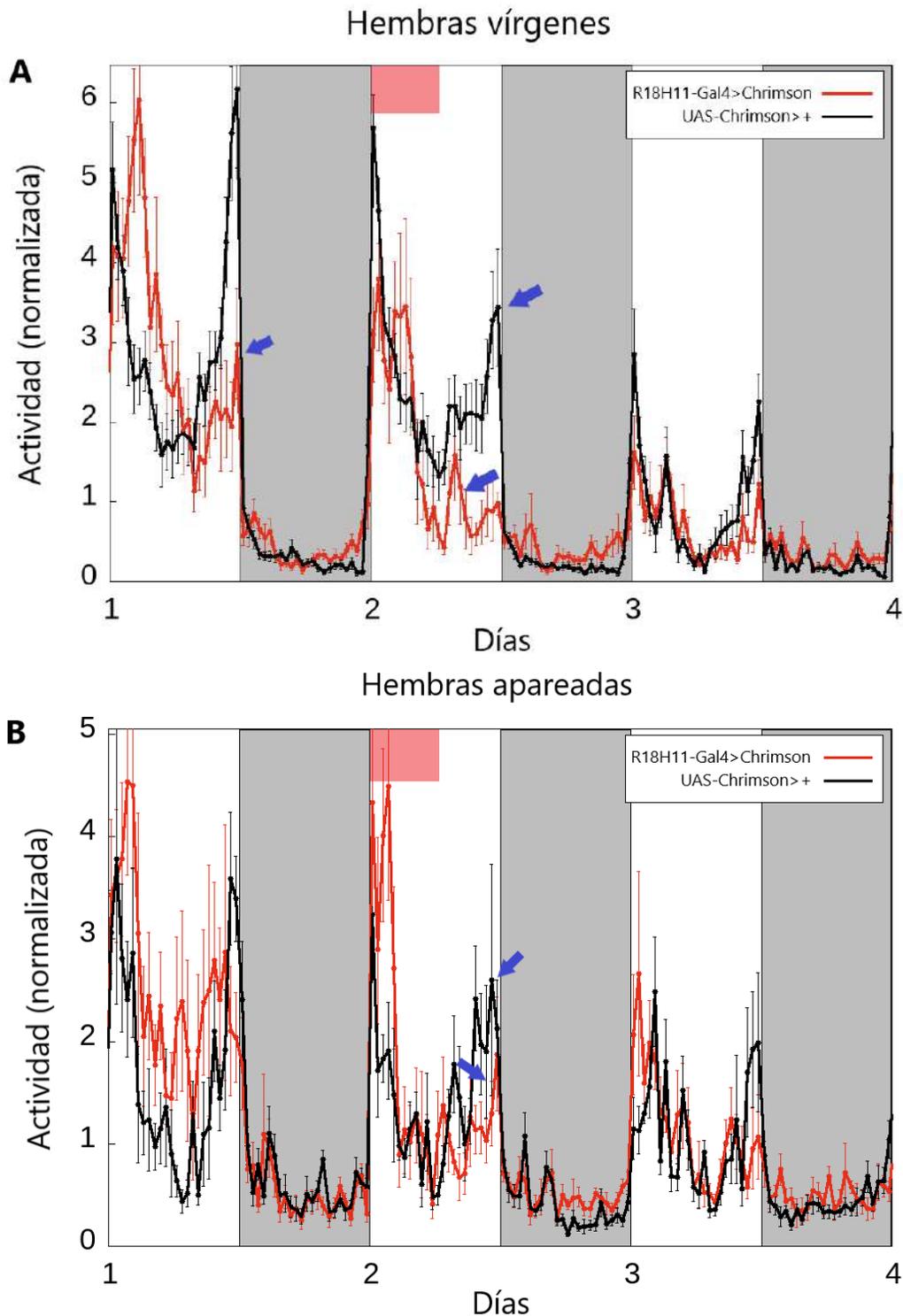


Figura 20: *Hembras R18H11-Gal4>Chrimson* A-B. Actograma: actividad locomotora normalizada para hembras vírgenes (izquierda) y hembras apareadas (derecha) (ecuación 1). En negro la actividad para el genotipo control *UAS-Chrimson>+* y en rojo para el genotipo "tratamiento" *R18H11-Gal4>Chrimson*. La transición entre el día y la noche (LO) se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente (ZT 0 = 8 AM, ZT 12 = 8 PM). La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs (ZT 0 - 5). Hembras vírgenes: controles N = 12, tratadas N = 12; hembras apareadas: controles N = 13, tratadas N = 9. Repeticiones del experimento = 1.

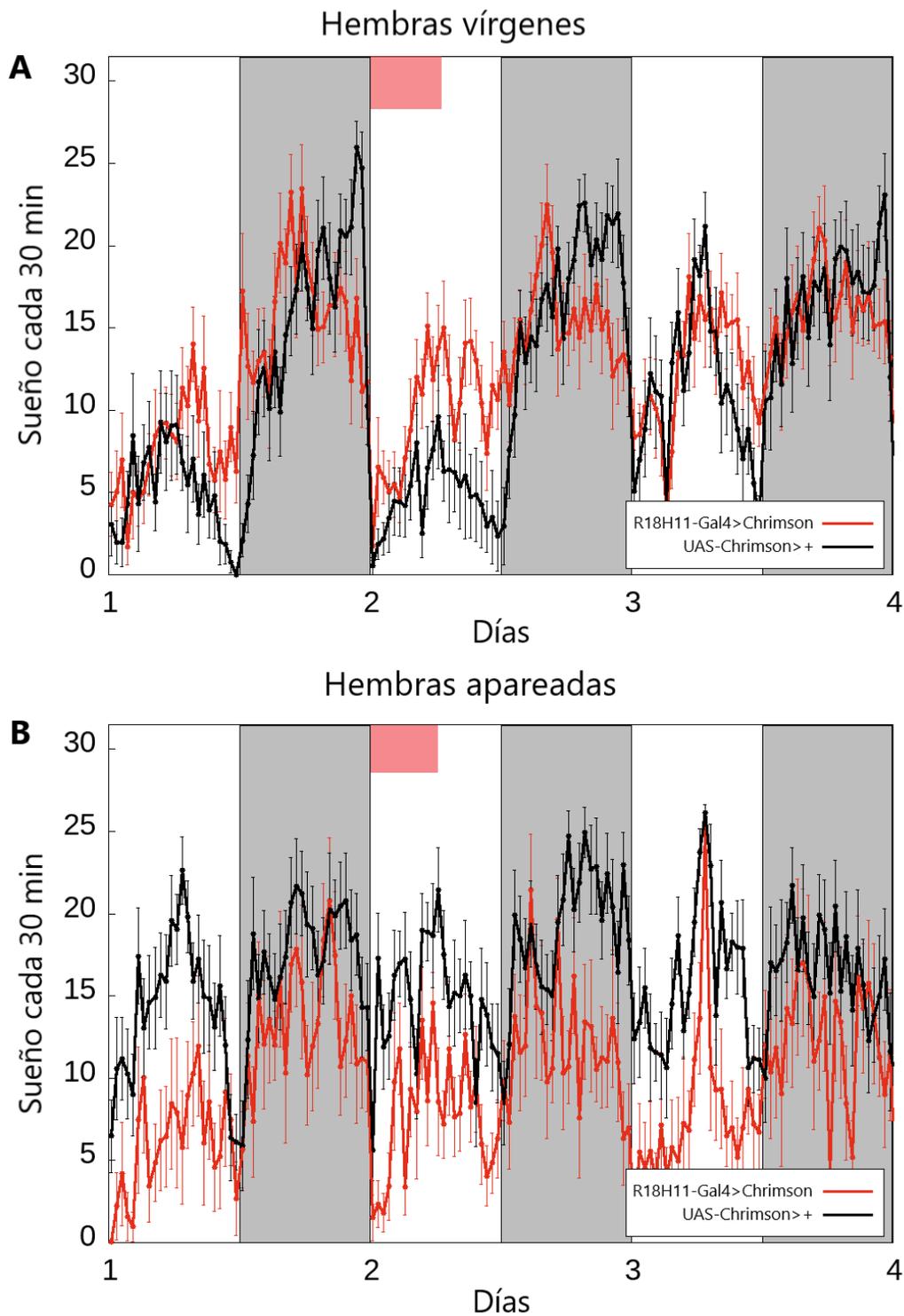


Figura 21: *Hembras R18H11-Gal4>Chrimson A-B*. Sueñograma: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora para hembras vírgenes (izquierda) y hembras apareadas (derecha). En negro el sueño para el control *UAS-Chrimson>+* y en rojo para *R18H11-Gal4>Chrimson*. La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs (ZT 0 - 5). Hembras vírgenes: controles N = 12, tratadas N = 12; hembras apareadas: controles N = 13, tratadas N = 9. Repeticiones del experimento = 1.

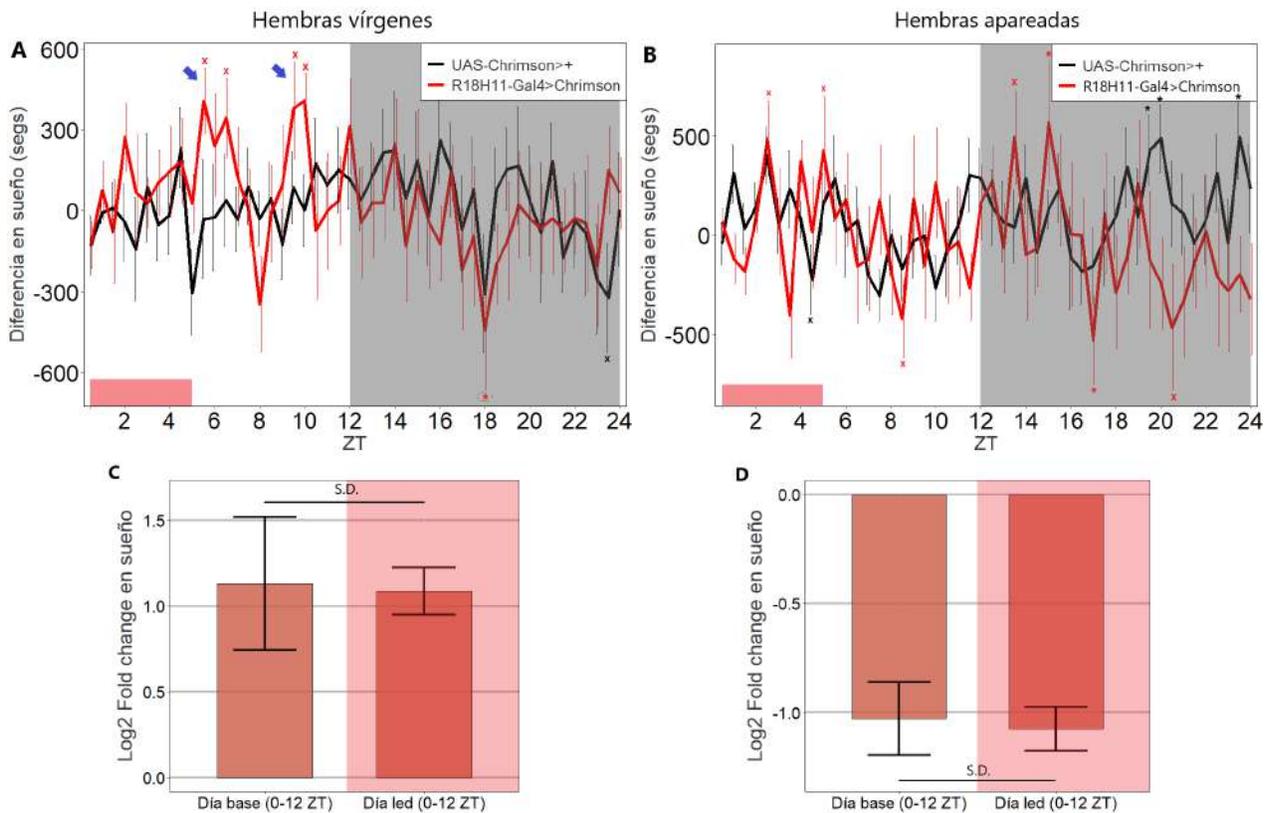


Figura 22: **Hembras *R18H11-Gal4*>*Chrimson*** **A-B**. Plot de substracción para hembras vírgenes (izquierda) y hembras apareadas (derecha) (ecuación 2), las barras indican  $\pm$  SE. En negro la actividad para el genotipo control *UAS-Chrimson*>+ y en rojo para el genotipo "tratamiento" *R18H11-Gal4*>*Chrimson*. La barra blanca y gris representan las horas de luz-oscuridad respectivamente y la barra roja horizontal muestra las horas de estimulación con LEDs (ZT 0 - 5). Día base: día 1. Contrastes bin a bin para los genotipos *R18H11-Gal4*>*Chrimson* y *UAS-Chrimson*>+ muestran si la diferencia *día estimulación* – *día base* es significativa. **C-D**. Fold change en sueño ZT 0 - 12 de las moscas tratadas respecto al control para hembras vírgenes (izquierda) y hembras apareadas (derecha) (ecuación 3). Las barras corresponden a  $\pm$  1 SE. Día base: día 1. Se realizó un test wilcoxon pareado para cada bin (hembras vírgenes:  $V = 121$ , p-value = 0.4223; hembras apareadas:  $V = 158$ , p-value = 0.8334). Hembras vírgenes: controles  $N = 12$ , tratadas  $N = 12$ ; hembras apareadas: controles  $N = 13$ , tratadas  $N = 9$ . Repeticiones del experimento = 1.

Los sueñogramas de las moscas *R18H11-Gal4*>*Chrimson* (figura 21A-B) no muestran una diferencia tan sustancial como los actogramas entre el día base y el resto de los días para ambos estados reproductivos, aunque sí se puede observar una cierta tendencia a aumentar la cantidad de sueño. Esto se corresponde con la pérdida gradual de actividad observada en los actogramas (figura 20A-B). Cuando se cuantifica la diferencia en el sueño diurno entre los genotipos mediante el fold change (figura 22C-D), no se encuentran diferencias significativas entre el día de estimulación y el día base para ambos casos (Hembras vírgenes:  $V = 121$ , p-value = 0.4223; hembras apareadas:  $V = 158$ , p-value = 0.8334). Sin embargo, cuando se analiza lo que sucede bin por bin, hay algunos bins donde hay una tendencia al aumento de sueño respecto al día base en hembras vírgenes *R18H11-Gal4*>*Chrimson* y no en los controles *UAS-Chrimson*>+ las horas posteriores a la estimulación LED (figura 22A, observar las flechas). En hembras apareadas, esta tendencia al aumento de sueño

diurno pareciera no existir o ser muy leve (figura 22B). Esto indicaría que sí hubo un efecto de la estimulación LED por encima del supuesto efecto base de la luz blanca, al menos, en las hembras vírgenes.

Las hembras vírgenes *R18H11-Gal4>Chrimson* duermen el doble que las *UAS-Chrimson>+*, mientras que en las apareadas ocurre lo inverso (figura 22C-D). Estas diferencias ya se pueden observar en los sueñoogramas correspondientes para cada estado reproductivo (figura 21A-B). La estimulación base de las neuronas DN1p por parte de la luz blanca puede explicar que las hembras vírgenes *R18H11-Gal4>Chrimson* tengan mayor sueño que las *R18H11-Gal4>+* en general.

Vírgenes y apareadas *R18H11-Gal4>Chrimson* respondieron de manera parecida en cuanto a la actividad locomotora a la estimulación optogenética matutina de las DN1ps; reduciendo su actividad sustancialmente en la segunda mitad del día (al punto de perder el pico E) (figura 20A-B, observar flechas). Sin embargo, las vírgenes parecen mostrar un aumento ligero de sueño en algunos bins y la apareadas no (figura 22A-B, observar las flechas). Que la cantidad de sueño en hembras apareadas sea menor respecto a sus controles (figura 20D) y el hecho que parecen haber respondido menos a la estimulación LED, levanta la sospecha de que la respuesta del circuito relojero a la activación de las DN1ps este reducida como parte de un efecto post-cópula en estas moscas.

Para determinar si se trata de un resultado biológicamente significativo, estos experimentos deben repetirse y ser consistentes con los resultados mostrados aquí. Para confirmar si existe un dimorfismo sexual, bajo la misma estimulación matutina en machos debe haber una clara diferencia respecto a lo visto aquí en hembras respecto a la respuesta locomotora y la cantidad de sueño. Los machos no deberían mostrar cambios significativos debido a que las DNps ya se encuentran activas durante la mañana como se muestra en la figura 5C.

### 4.3. Activación de las neuronas PDF

El neuropéptido PDF cumple la función de sincronizador del circuito circadiano (Peng et al., 2003; Lin, 2004; Peng et al., 2003; Choi et al., 2012) y juega un rol clave en el mantenimiento de un ritmo locomotor coherente (Renn et al., 1999). También, un subgrupo de neuronas PDF-positivas, las s-LNvs, han sido propuestas como el oscilador principal en el circuito relojero en *D. melanogaster* (Grima et al., 2004). De esta manera, las neuronas marcadas bajo el promotor de *Pdf* constituyen un excelente blanco para manipular su actividad y observar respuestas fenotípicas.

#### 4.3.1. Activación de las neuronas PDF en machos y hembras vírgenes

En busca de posibles dimorfismos sexuales en el accionar de estas neuronas a lo largo del día, se estimuló su actividad en la mañana (ZT 0 - 5) y la tarde (ZT 7 - 12) en machos y hembras vírgenes *D. melanogaster*.

Tanto la estimulación matutina (Día 5) como vespertina (Día 2) no generó ningún cambio significativo en la actividad tanto para machos como para hembras. Se observa sin embargo, una clara respuesta *startle* de ambos genotipos en machos y hembras cuando las neuronas PDF son activadas durante la tarde. La actividad del pico E durante el día de estimulación es mayor y mas amplia que los demás días (figura 23A-B, observar flechas).

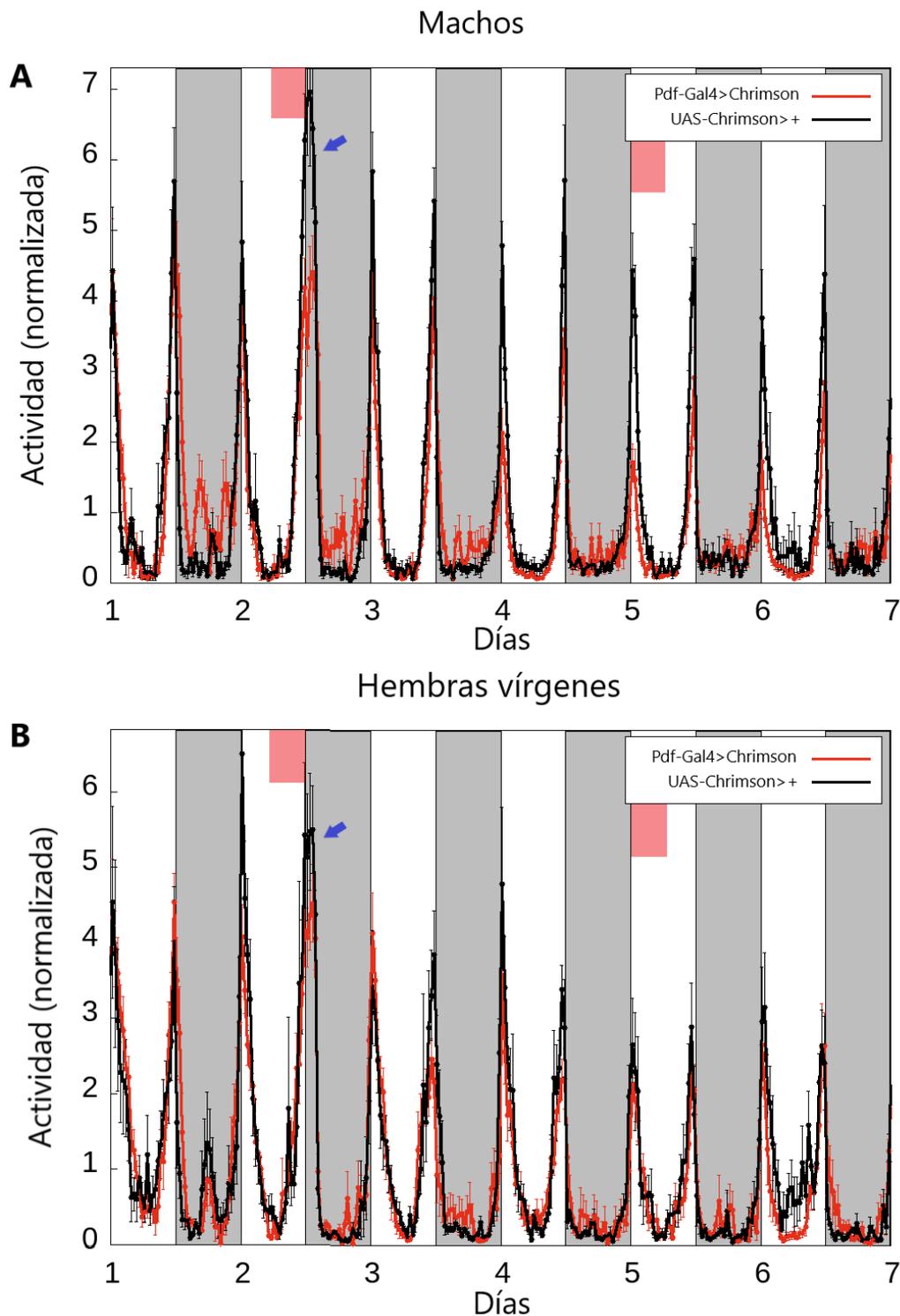


Figura 23: *Machos y hembras vírgenes Pdf-Gal4>Chrimson A-B*. Actograma: actividad locomotora normalizada para machos (izquierda) y hembras vírgenes (derecha) (ecuación 1). En negro la actividad para el control *UAS-Chrimson>+* y en rojo para el genotipo "tratamiento" *Pdf-Gal4>Chrimson*. La transición entre el día y la noche (LO) se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente (ZT 0 = 8 AM, ZT 12 = 8 PM). La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs (día 2: ZT 7 - 12; día 5: ZT 0 - 5). Machos: controles N = 9, tratadas N = 12; hembras vírgenes: controles N = 9, tratadas N = 10. Repeticiones del experimento = 1.

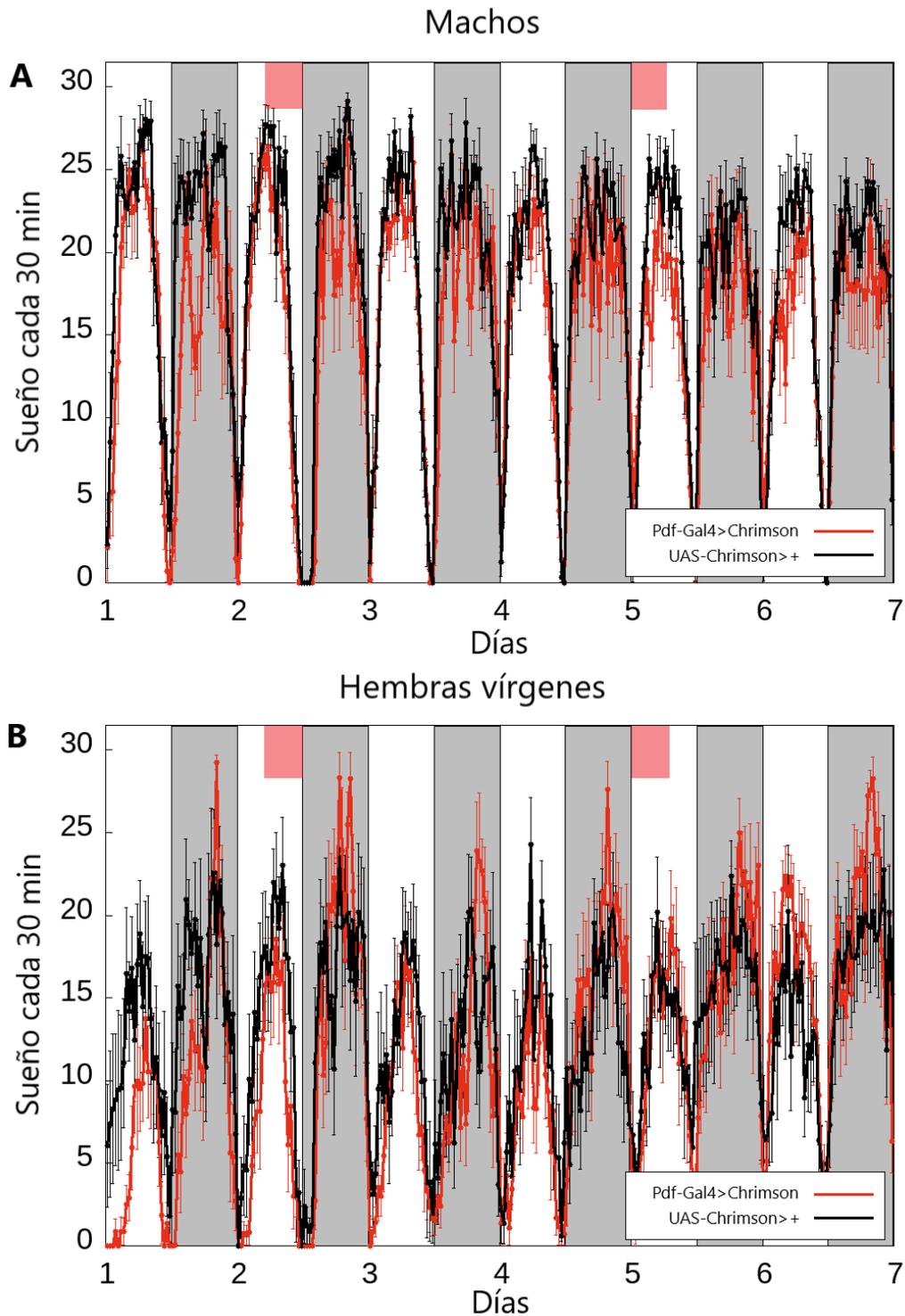


Figura 24: *Machos y hembras vírgenes Pdf-Gal4>Chrimson A-B*. Sueñograma: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora para machos (izquierda) y hembras vírgenes (derecha). En negro el sueño para el control *UAS-Chrimson>+* y en rojo para *Pdf-Gal4>Chrimson*. Machos: controles N = 9, tratadas N = 12; hembras vírgenes: controles N = 9, tratadas N = 10. Repeticiones del experimento = 1.

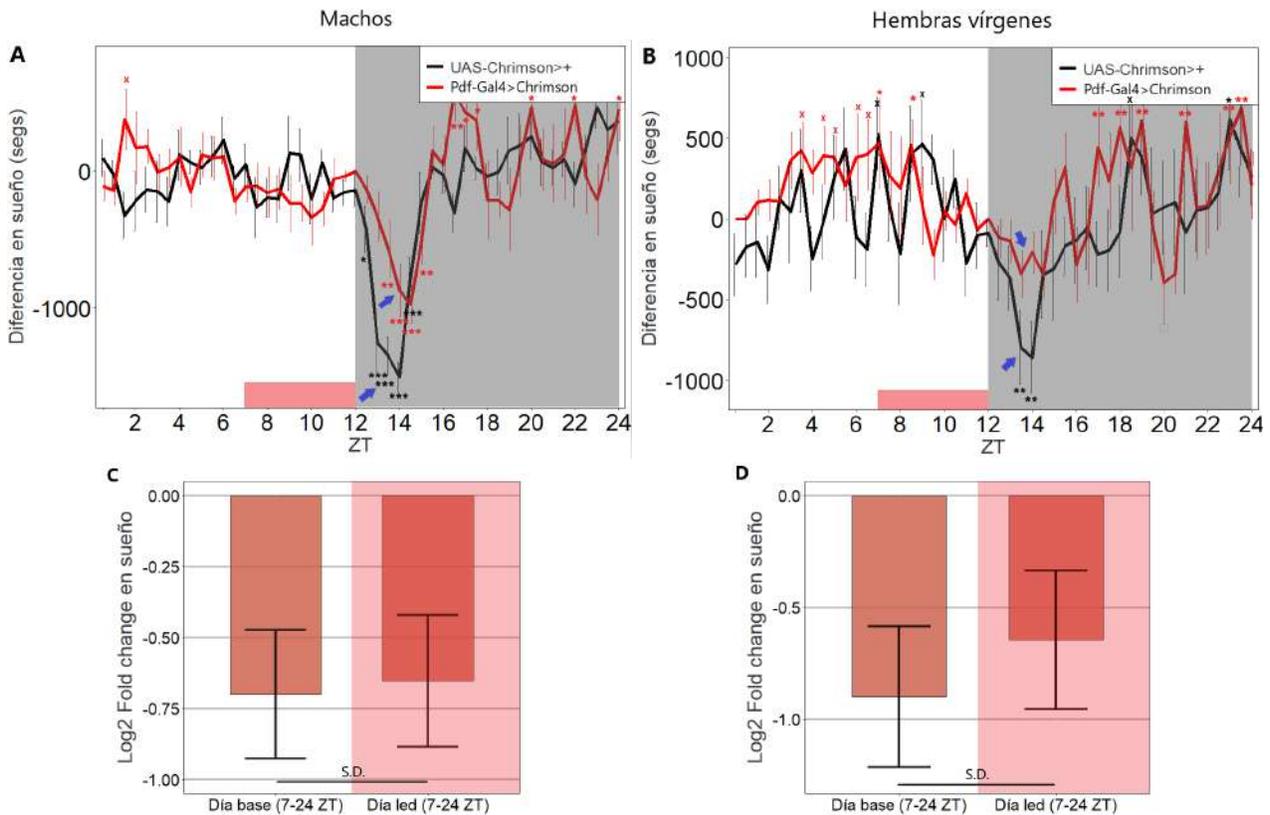


Figura 25: *Machos y hembras vírgenes Pdf-Gal4>Chrimson* A-B. Plot de substracción para machos (izquierda) y hembras vírgenes (derecha) (ecuación 2), las barras indican  $\pm$  SE. En negro la actividad para el control *UAS-Chrimson>+* y en rojo para el genotipo "tratamiento" *Pdf-Gal4>Chrimson*. La barra blanca y gris representan las horas de luz-oscuridad respectivamente y la barra roja horizontal muestra las horas de estimulación con LEDs (día 2: ZT 7 - 12). Día base: día 1. Contrastes bin a bin para los genotipos *Pdf-Gal4>Chrimson* y *UAS-Chrimson>+* muestran si la diferencia *día estimulación* - *día base* es significativa. C-D. Fold change en sueño ZT 5 - 12 de las moscas tratadas respecto al control para machos (izquierda) y hembras vírgenes (derecha) (ecuación 3). Las barras corresponden a  $\pm$  1 SE. Día base: día 1. Se realizó un test t pareado para cada bin (machos:  $t = -0.16049$ ,  $df = 33$ ,  $p\text{-value} = 0.8735$ ; hembras vírgenes:  $t = -0.61972$ ,  $df = 33$ ,  $p\text{-value} = 0.5397$ ). Machos: controles  $N = 9$ , tratadas  $N = 12$ ; hembras vírgenes: controles  $N = 9$ , tratadas  $N = 10$ . Repeticiones del experimento = 1.

En los plots de substracción (figura 25A-B) se ve claramente la respuesta *startle* de ambos genotipos, aunque es menos pronunciada para el genotipo tratado *Pdf-Gal4>Chrimson* que para el control *UAS-Chrimson>+* (observar flechas). Para ambos sexos, las moscas *Pdf-Gal4>Chrimson* tienen menos sueño nocturno que sus controles tanto para el día base como para el día de estimulación LED vespertino (machos:  $t = -0.16049$ ,  $df = 33$ ,  $p\text{-value} = 0.8735$ ; hembras:  $t = -0.61972$ ,  $df = 33$ ,  $p\text{-value} = 0.5397$ ) (figura 25C-D).

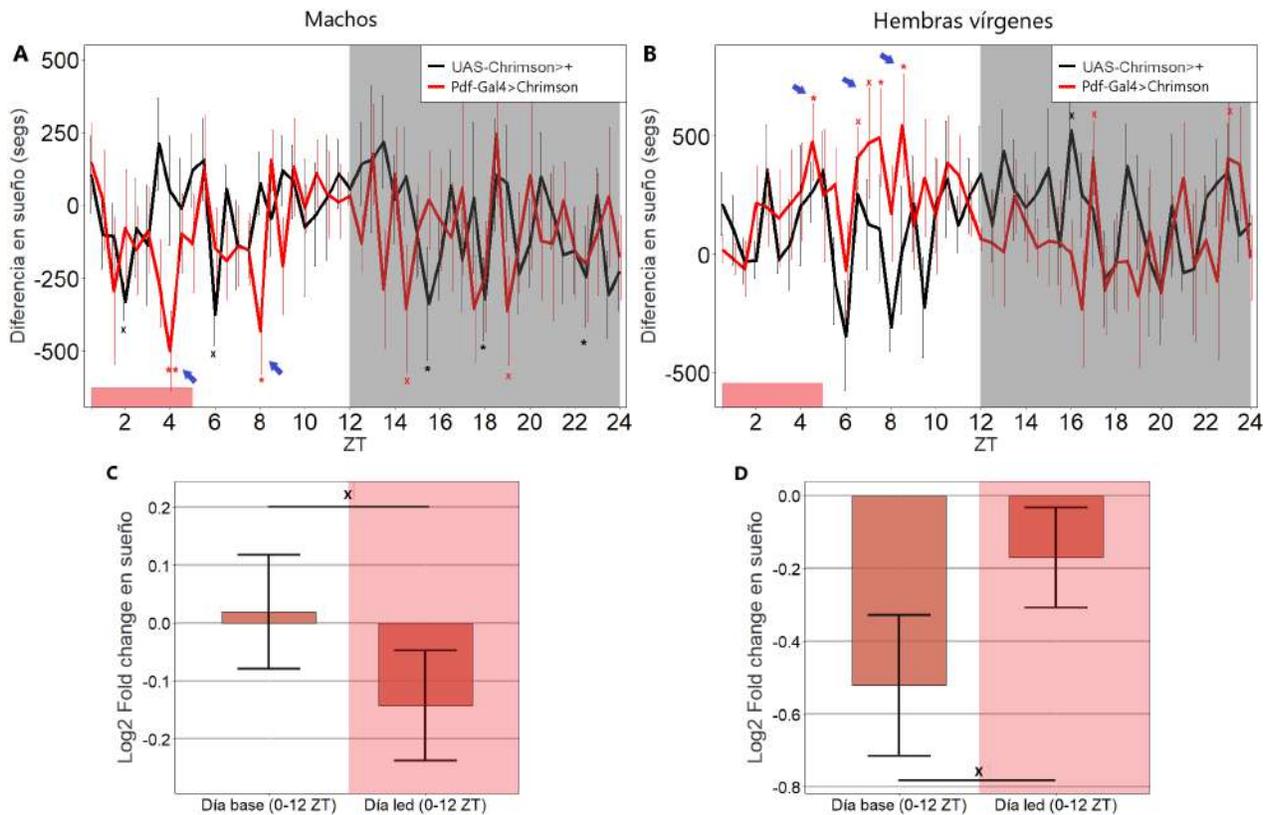


Figura 26: *Machos y hembras vírgenes Pdf-Gal4 > Chrimson* A-B. Plot de substracción para machos (izquierda) y hembras vírgenes (derecha) (ecuación 2), las barras indican  $\pm$  SE. En negro la actividad para el control *UAS-Chrimson > +* y en rojo para el genotipo "tratamiento" *Pdf-Gal4 > Chrimson*. La barra blanca y gris representan las horas de luz-oscuridad respectivamente y la barra roja horizontal muestra las horas de estimulación con LEDs (día 5: ZT 0 - 5). Día base: día 4. Contrastes bin a bin para los genotipos *Pdf-Gal4 > Chrimson* y *UAS-Chrimson > +* muestran si la diferencia *día estimulación* - *día base* es significativa. C-D. Fold change en sueño ZT 5 - 12 de las moscas tratadas respecto al control para machos (izquierda) y hembras vírgenes (derecha) (ecuación 3). Las barras corresponden a  $\pm$  1 SE. Día base: día 4. Se realizó un test t y un test de Wilcoxon pareado para cada bin para machos y hembras vírgenes correspondientemente (machos:  $t = 1.8667$ ,  $df = 23$ ,  $p\text{-value} = 0.07475$ ; hembras vírgenes:  $V = 90$ ,  $p\text{-value} = 0.08937$ ). Machos: controles  $N = 9$ , tratadas  $N = 12$ ; hembras vírgenes: controles  $N = 9$ , tratadas  $N = 10$ . Repeticiones del experimento = 1.

Se observan diferencias en alguno bins para las moscas *Pdf-Gal4 > Chrimson* cuando se cuantifica el cambio en la cantidad de sueño entre el día base y el día de estimulación LED matutino (figura 26A-B). La estimulación de las neuronas PDF por la mañana parece aumentar el sueño en hembras vírgenes *Pdf-Gal4 > Chrimson* (figura 26B, observar flechas sobre línea roja) pero no afectar o incluso reducir levemente el sueño en machos (figura 26A, observar flechas sobre línea roja). El fold change en sueño también muestra esta misma tendencia, ya que en machos se reduce el sueño diurno (figura 26C,  $t = 1.8667$ ,  $df = 23$ ,  $p\text{-value} = 0.07475$ ) y en hembras aumenta (figura 26D,  $V = 90$ ,  $p\text{-value} = 0.08937$ ) para el día de estimulación LED respecto a sus días base.

Esta diferencia de respuesta a la estimulación matutina de la actividad de las neuronas PDF podría constituir un dimorfismo sexual. Para que estos resultados sean biológicamente significativos se debe repetir estos experimentos y obtener los mismos resultados de manera consistente a lo largo de las repeticiones.

#### 4.3.2. Activación de las neuronas PDF en hembras apareadas

Se ha mostrado que las neuronas PDF son responsables de un comportamiento locomotor en machos denominado anticipación de la mañana (Renn et al., 1999; Stoleru et al., 2004). Dicho comportamiento consiste en un aumento progresivo de la actividad locomotora que anticipa la transición noche-día (figura 3A, línea azul). Resultados del laboratorio muestran que la anticipación de la mañana se pierde en hembras apareadas (figura 3A, línea roja) y que los niveles de PDF en el protocerebro dorsal son más bajos que en machos y hembras vírgenes (Riva et al., 2022, manuscrito en revisión). Estos resultados sugieren que las neuronas PDF estarían silenciadas en las horas previas al día en hembras apareadas como parte de un efecto post-cópula sobre el marcapasos central.

Un experimento ideal, consistiría en intentar recuperar la anticipación de la mañana en hembras apareadas mediante la estimulación de las neuronas PDF unas horas antes del encendido de las luces. Sin embargo, como ya se ha discutido, esto no es posible mediante la activación optogenética de *CsChrimson*, ya que éste método no es conveniente para la estimulación nocturna. Por ello, es que se intentó estimular a estas neuronas en las últimas horas de la tarde (ZT 7 - 12) para explorar la posibilidad de que su activación vespertina cause un efecto de anticipación de la mañana unas horas después (en ZT 18 - 24).

La estimulación por la tarde (ZT 5 - 12) en hembras apareadas, produjo tanto en el genotipo *Pdf-Gal4 > Chrimson* como en el control *UAS-Chrimson > +* un efecto *startle* que consistió en un pico E más amplio que el día base (figura 27A, observar flecha), respuesta ya vista en machos y hembras en los experimentos anteriores. Las últimas horas del día de estimulación (día 2) no muestran un comportamiento anticipatorio tanto en el actograma como en el sueñoograma (figura 27A-B, observar flecha en la noche del día dos en el actograma). Cuando se cuantifica la anticipación de mañana, tampoco se observa un aumento entre el día de estimulación y el día de base para el genotipo *Pdf-Gal4 > Chrimson* por ninguno de los dos métodos de cálculo (figura 27C-D). Extrañamente, todas las moscas disminuyeron su actividad considerablemente el día de recuperación (figura 27A, día 3). Queda abierta la incognita si la falta de recuperación de actividad anticipatoria se dió porque la activación vespertina no ejerce ningún efecto en el comportamiento varias horas posteriores a la estimulación, o porque el disparo de las neuronas PDF no tiene influencia en este comportamiento en hembras apareadas.

Para responder esta pregunta abierta hace falta un método de activación agudo utilizable en completa oscuridad, que no traiga consigo efectos secundarios en el comportamiento para que la respuesta que se vea sea claramente atribuible a la activación neuronal.

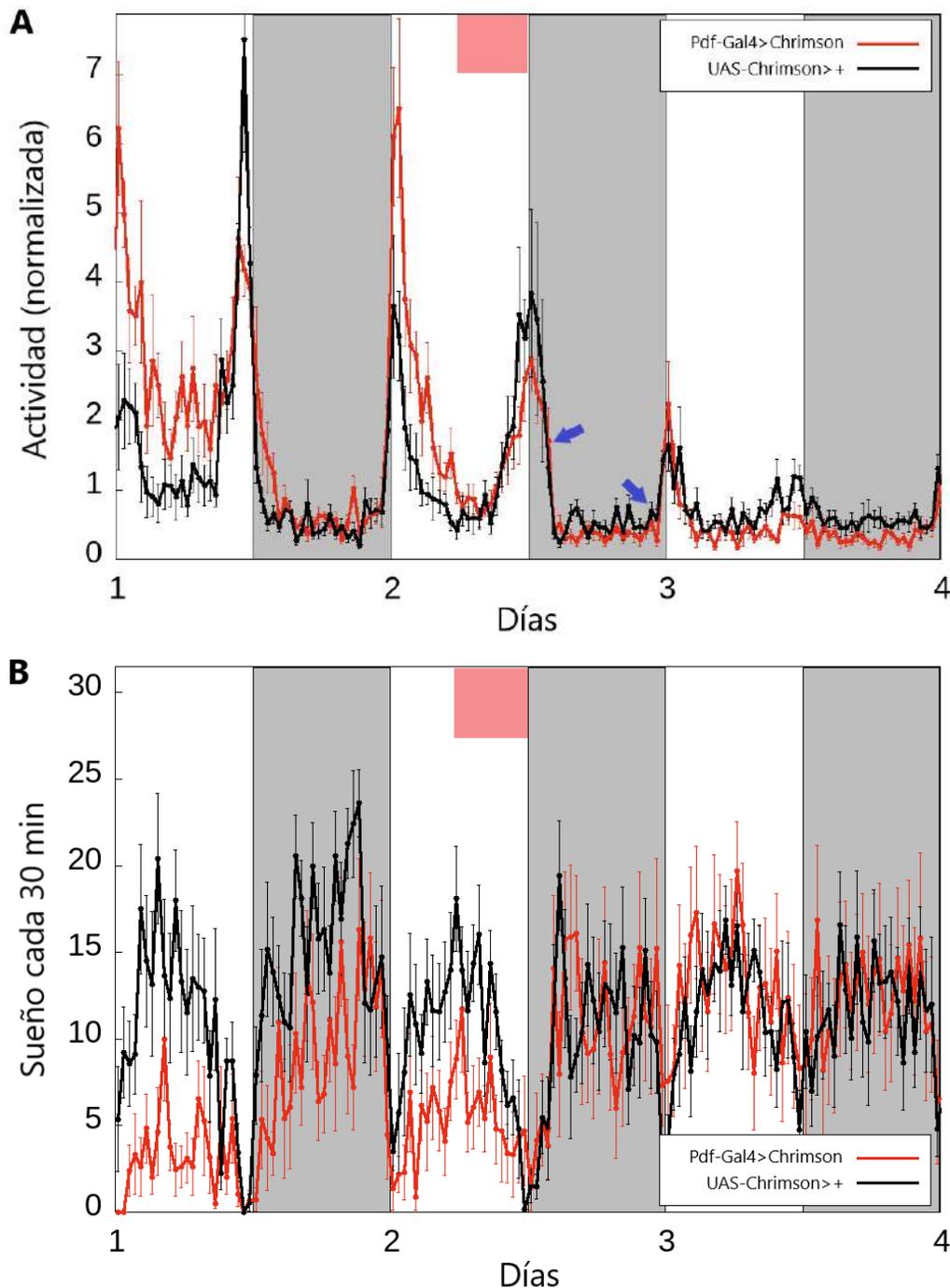


Figura 27: *Hembras apareadas Pdf-Gal4>Chrimson* **A.** Actograma: actividad locomotora normalizada (ecuación 1). En negro la actividad para el control *UAS-Chrimson>+* (N = 10) y en rojo para el genotipo "tratamiento" *Pdf-Gal4>Chrimson* (N = 10). La transición entre el día y la noche (LO) se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente (ZT 0 = 8 AM, ZT 12 = 8 PM). La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs (día 2: ZT 7- 12). **B.** Sueñograma: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora. En negro el sueño para el control *UAS-Chrimson>+* y en rojo para *Pdf-Gal4>Chrimson*. La transición LO se muestra con las barras blancas y grises correspondientemente. La barra roja indica las horas de estimulación con LEDs. Repeticiones del experimento = 1.

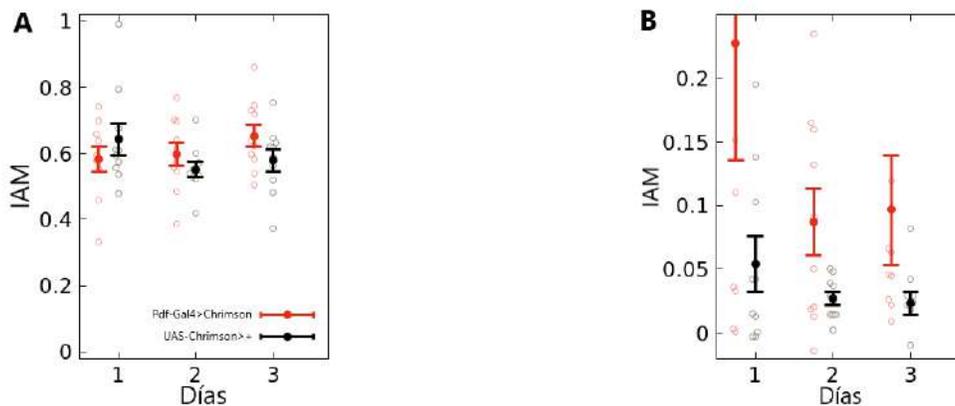


Figura 28: *Hembras apareadas Pdf-Gal4 > Chrimson* **A.** Índice de anticipación de la mañana (IAM) número 1 (ecuación 4). **B.** Índice de anticipación de la mañana (IAM) número 2 (ecuación 5 y 6). Repeticiones del experimento = 1.

## 5. Conclusiones

### 5.1. Activación de las neuronas DN1p

El subgrupo de neuronas glutamatérgicas DN1p controla el sueño diurno en machos (Guo et al., 2016). En este trabajo, se intentó replicar el resultado visto en Guo et al. (2016), la supresión del pico E (figura 5A) sin éxito. Lo que se observó fue una diferencia en la magnitud de la respuesta *startle* entre el genotipo tratamiento *R18H11-Gal4 > Chrimson* y el control *UAS-Chrimson > +* cuando se extiende la estimulación durante toda la noche (12A-B) y una respuesta alerta solo presente en controles cuando se estimula solo por el día (figura 16A-B y 18A). Se infiere que en el genotipo tratado el accionar “adormecedor” del grupo relojero reduce la respuesta alerta homeostática vista en los controles. El hecho de no haber podido obtener los resultados exactamente como se muestran en Guo et al. (2016) (figura 5A) se pudo deber a que no se logró replicar suficientemente bien todas las condiciones experimentales del trabajo citado. Sin embargo, resulta curioso que en dicho trabajo no se muestra una respuesta *startle* clara (figura 5B) que es obvia en los experimentos de este presente trabajo, lo cual pone en discusión la reproducibilidad de sus resultados.

Cuando se estimuló por la mañana a las hembras, se observó una respuesta relativamente parecida en las moscas *R18H11-Gal4 > Chrimson* independientemente del estado reproductivo de estas. Dicha respuesta también se diferenció de los controles en ambos casos. La activación matutina de las DN1ps produjo una reducción considerable de la actividad tanto en hembras vírgenes como en apareadas (figura 20A-B) y un tímido aumento del sueño diurno en hembras vírgenes (figura 22A-B). Que este aumento no se haya dado en hembras apareadas podría deberse a un efecto post-cópula en el funcionamiento de las DN1ps o de sus contactos post-sinápticos. Sin embargo, lo que se esperaba era lo inverso: que esto sucediera en hembras apareadas pero no en las vírgenes, ya que posiblemente el patrón de disparo de las neuronas DN1p en ellas sea igual que en los machos (figura 5D) ya que su actividad locomotora es similar a estos (figura 3A). Por ende, activar a las DN1ps por la mañana no debería implicar grandes respuestas locomotoras o de sueño en las hembras vírgenes porque éstas neuronas ya se encontrarían activas. Como este no fue el caso, para determinar si efectivamente se trata de un dimorfismo sexual en el patrón de disparo diario de las DN1ps, se deberían repetir estos mismos experimentos en busca de consistencia en los resultados mostrados aquí, así como evaluar la respuesta en machos a la misma estimulación matutina. Por último, que el aumento de sueño

se haya observado en hembras vírgenes pero no en las apareadas, podría indicar una reducción o inhibición de la respuesta a la actividad de las DN1ps como parte de un efecto post-cópula sobre el marcapasos central aún no descrito.

## 5.2. Activación de las neuronas PDF

Un subgrupo de neuronas PDF (las s-LNvs o células M) son responsables por el pico M (Renn et al., 1999). Además, la liberación circadiana de PDF es necesaria para la sincronización de la maquinaria relojera entre los grupos del marcapasos central y para un buen ritmo locomotor general (Peng et al., 2003; Lin, 2004; Peng et al., 2003; Choi et al., 2012). En este trabajo se estimuló mediante luz roja durante las primeras horas de la mañana y las últimas horas de la tarde las neuronas PDF en hembras vírgenes y machos en busca de respuestas locomotoras sexualmente dimórficas.

La respuesta a la luz roja por parte de los genotipos *Pdf-Gal4>Chrimson* y *UAS-Chrimson>+* en ambos sexos fue la misma para la estimulación vespertina. Las moscas mostraron una respuesta alerta que significo una mayor amplitud del pico E comparado con el día base, el cual se extendió por aproximadamente una hora y media durante la noche (figura 25A-B). La estimulación matutina en machos no generó ningún efecto considerable sobre la actividad (figura 23A) pero si se observó una tendencia a la reducción del sueño diurno en las moscas *Pdf-Gal4>Chrimson* (figura 26C-D). Sin embargo, en las hembras vírgenes ocurrió lo contrario, las moscas *Pdf-Gal4>Chrimson* tuvieron un aumento en la cantidad de sueño diurno respecto a sus controles y al día base (figura 26, columna derecha). Esta respuesta diferencial podría significar un dimorfismo sexual en el patrón de dispario circadiano de las neuronas PDF o de las células M, o de la respuesta de los grupos postsinápticos de estas neuronas. Para validar estos resultados, futuras repeticiones de este experimento deberían dar resultados consistentes con los de este trabajo, así como también se debería validar mediante el uso de otras herramientas de estimulación aguda de la actividad neuronal.

Las neuronas PDF son responsables de un comportamiento locomotor en machos denominado anticipación de la mañana (Renn et al., 1999; Stoleru et al., 2004). Dicho comportamiento se pierde en hembras apareadas (figura 3A, línea roja) (Riva et al. 2022, manuscrito en revisión). También, resultados de Riva et al. (2022) (manuscrito en revisión) muestran que los niveles de PDF en el protocerebro dorsal son más bajos por la mañana en hembras apareadas que en machos y hembras vírgenes. Estos resultados sugieren que las neuronas PDF estarían silenciadas en las horas previas al día, siendo las responsables de la pérdida de anticipación de la mañana como parte de un efecto post-cópula sobre el marcapasos central. En este trabajo se intentó recuperar los niveles de PDF durante la mañana activando a dichas neuronas a la tarde (ZT 7-12) del día anterior y así recuperar la anticipación de la mañana en las hembras apareadas.

No se logró recuperar la anticipación de la mañana en el genotipo tratado *Pdf-Gal4>Chrimson* (figura 27C-D) y también se observó el efecto *startle* en ambos genotipos ya visto en experimentos anteriores donde se estimuló por la tarde; una mayor amplitud del pico E, que se prolonga hacia la noche. Los resultados de este experimento no permiten discernir si no se recuperó la anticipación porque la estimulación por la tarde no es suficiente, o porque el disparo de las neuronas PDF no es suficiente para recuperar dicho comportamiento.

## 5.3. Alcances y limitaciones de la estimulación optogenética con CsChrimson

En todos los experimentos donde se estimuló con luz roja solo por la tarde (ZT 7 - 12) o por la tarde y noche (ZT 7 - 24) se puede observar un aumento de la actividad locomotora durante o en las horas posteriores inmediatas a la estimulación, en especial en los genotipos controles más

que en los tratados. Dicho aumento en la actividad es todavía más evidente durante las horas de oscuridad. Esta respuesta *startle*, es un claro indicador de que la intensidad de la luz LED roja es suficiente para ser percibida por parte de las moscas, en concordancia con lo mostrado recientemente respecto a los espectros de absorción de los pigmentos de sus ojos (Sharkey et al., 2020). Por esta razón, la herramienta limita su uso a la horas de día en donde no existe un cambio tan brusco entre la intensidad de la luz blanca y la de la luz LED, y por lo tanto la respuesta *startle* no es tan importante, aunque todavía se encuentra presente. Este hecho constituye un inconveniente a la hora de interpretar los efectos específicos de la activación neuronal, ya que estos se infieren de la diferencia en la magnitud de la respuesta *startle* entre el genotipo que expresa *Cschrimsom* y el control.

La estimulación matutina (ZT 0 - 5) por otra parte, no muestra tal respuesta alerta en las moscas controles, lo cual facilita discriminar el efecto de la activación neuronal. Se cree que esta diferencia respecto a la estimulación por la tarde es debido a que las luces continúan prendidas cuando termina la iluminación LED, reduciendo el contraste en las intensidades de luz que perciben las moscas de un momento a otro.

Esta herramienta resulta poco útil para el estudio de la modulación aguda de la actividad neuronal y su uso debe estar restringido a las horas del día. Se debe evitar cambios de luz bruscos cuando se estimula, por lo que se recomienda su uso solo a la mañana o durante la tarde, siempre y cuando haya todavía algunas horas de luz ambiental antes de la transición Dia-Noche una vez finalizado el estímulo.

## Agradecimientos

Se agradece a mis directores de tesis Lorena Franco y Sebastian Risau, y a mi compañera de laboratorio Sabrina Riva, por los consejos, correcciones y ayuda tanto en los aspectos teóricos como prácticos del desarrollo del presente trabajo.

## Referencias

- Ahmad Myra, Li Wanhe, Top Deniz. Integration of Circadian Clock Information in the *Drosophila* Circadian Neuronal Network // Journal of Biological Rhythms. VI 2021. 36, 3. 203–220.
- Barrett Rk, Takahashi Js. Temperature compensation and temperature entrainment of the chick pineal cell circadian clock // The Journal of Neuroscience. VIII 1995. 15, 8. 5681–5692.
- Bhadra Utpal, Thakkar Nirav, Das Paromita, Pal Bhadra Manika. Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human // Sleep Medicine. VII 2017. 35. 49–61.
- Bloch Qazi Margaret C, Heifetz Yael, Wolfner Mariana F. The developments between gametogenesis and fertilization: ovulation and female sperm storage in *drosophila melanogaster* // Developmental Biology. IV 2003. 256, 2. 195–211.
- Brand A.H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // Development. VI 1993. 118, 2. 401–415.
- Bulthuis Nicholas, Spontak Katrina R., Kleeman Benjamin, Cavanaugh Daniel J. Neuronal Activity in Non-LNV Clock Cells Is Required to Produce Free-Running Rest:Activity Rhythms in *Drosophila* // Journal of Biological Rhythms. VI 2019. 34, 3. 249–271.

- Cascallares Guadalupe, Riva Sabrina, Franco D. Lorena, Risau-Gusman Sebastian, Gleiser Pablo M.* Role of the circadian clock in the statistics of locomotor activity in *Drosophila* // PLOS ONE. VIII 2018. 13, 8. e0202505.
- Cavanaugh Daniel J., Geratowski Jill D., Woollorton Julian R.A., Spaethling Jennifer M., Hector Clare E., Zheng Xiangzhong, Johnson Erik C., Eberwine James H., Sehgal Amita.* Identification of a Circadian Output Circuit for Rest:Activity Rhythms in *Drosophila* // Cell. IV 2014. 157, 3. 689–701.
- Chatterjee Abhishek, Lamaze Angélique, De Joydeep, Mena Wilson, Chélot Elisabeth, Martin Béatrice, Hardin Paul, Kadener Sebastian, Emery Patrick, Rouyer François.* Reconfiguration of a Multi-oscillator Network by Light in the *Drosophila* Circadian Clock // Current Biology. VII 2018. 28, 13. 2007–2017.e4.
- Choi Charles, Cao Guan, Tanenhaus Anne K., McCarthy Ellena v., Jung Misun, Schleyer William, Shang Yuhua, Rosbash Michael, Yin Jerry C.P., Nitabach Michael N.* Autoreceptor Control of Peptide/Neurotransmitter Corelease from PDF Neurons Determines Allocation of Circadian Activity in *Drosophila* // Cell Reports. VIII 2012. 2, 2. 332–344.
- Delventhal Rebecca, O'Connor Reed M, Pantalia Meghan M, Ulgherait Matthew, Kim Han X, Basturk Maylis K, Canman Julie C, Shirasu-Hiza Mimi.* Dissection of central clock function in *Drosophila* through cell-specific CRISPR-mediated clock gene disruption // eLife. X 2019. 8. e48308.
- Dissel Stephane, Hansen Celia N., Özkaya Özge, Hemsley Matthew, Kyriacou Charalambos P., Rosato Ezio.* The Logic of Circadian Organization in *Drosophila* // Current Biology. X 2014. 24, 19. 2257–2266.
- Duhart José M., Herrero Anastasia, Cruz Gabriel de la, Ispizua Juan I., Pérez Nicolás, Ceriani M. Fernanda.* Circadian Structural Plasticity Drives Remodeling of E Cell Output // Current Biology. XII 2020. 30, 24. 5040–5048.e5.
- Ewer J, Frisch B, Hamblen-Coyle Mj, Rosbash M, Hall Jc.* Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioral rhythms // The Journal of Neuroscience. IX 1992. 12, 9. 3321–3349.
- Feiler R, Bjornson R, Kirschfeld K, Mismar D, Rubin Gm, Smith Dp, Socolich M, Zuker Cs.* Ectopic expression of ultraviolet-rhodopsins in the blue photoreceptor cells of *Drosophila*: visual physiology and photochemistry of transgenic animals // The Journal of Neuroscience. X 1992. 12, 10. 3862–3868.
- Feng Kai, Palfreyman Mark T., Häsemeyer Martin, Talsma Aaron, Dickson Barry J.* Ascending SAG Neurons Control Sexual Receptivity of *Drosophila* Females // Neuron. VII 2014. 83, 1. 135–148.
- Franco D. Lorena, Frenkel Lia, Ceriani M. Fernanda.* The Underlying Genetics of *Drosophila* Circadian Behaviors // Physiology. I 2018. 33, 1. 50–62.
- Giebultowicz Jadwiga M.* Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. XI 2001. 356, 1415. 1791–1799.

- Gorostiza E. Axel, Depetris-Chauvin Ana, Frenkel Lia, Pérez Nicolás, Ceriani María Fernanda.* Circadian Pacemaker Neurons Change Synaptic Contacts across the Day // *Current Biology*. IX 2014. 24, 18. 2161–2167.
- Grima Brigitte, Chélot Elisabeth, Xia Ruohan, Rouyer François.* Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain // *Nature*. X 2004. 431, 7010. 869–873.
- Guo Fang, Yu Junwei, Jung Hyung Jae, Abruzzi Katharine C., Luo Weifei, Griffith Leslie C., Rosbash Michael.* Circadian neuron feedback controls the *Drosophila* sleep–activity profile // *Nature*. VIII 2016. 536, 7616. 292–297.
- Hardin Paul E.* The Circadian Timekeeping System of *Drosophila* // *Current Biology*. IX 2005. 15, 17. R714–R722.
- Harmer Stacey L., Panda Satchidananda, Kay Steve A.* Molecular Bases of Circadian Rhythms // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. XI 2001. 17, 1. 215–253.
- Helfrich-Förster Charlotte.* Differential Control of Morning and Evening Components in the Activity Rhythm of *Drosophila melanogaster* —Sex-Specific Differences Suggest a Different Quality of Activity // *Journal of Biological Rhythms*. IV 2000. 15, 2. 135–154.
- Helfrich-Förster Charlotte.* The locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster* is controlled by a dual oscillator system // *Journal of Insect Physiology*. VII 2001. 47, 8. 877–887.
- Helfrich-Förster Charlotte.* The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of *Drosophila melanogaster*: *Drosophila* Circadian Clock // *Microscopy Research and Technique*. X 2003. 62, 2. 94–102.
- Helfrich-Förster Charlotte, Shafer Orié T., Wülbeck Corinna, Grieshaber Eva, Rieger Dirk, Taghert Paul.* Development and morphology of the clock-gene-expressing lateral neurons of *Drosophila melanogaster* // *The Journal of Comparative Neurology*. I 2007. 500, 1. 47–70.
- Honjo Ken, Hwang Richard Y, Tracey William Daniel.* Optogenetic manipulation of neural circuits and behavior in *Drosophila* larvae // *Nature Protocols*. VIII 2012. 7, 8. 1470–1478.
- Häsemeyer Martin, Yapici Nilay, Heberlein Ulrike, Dickson Barry J.* Sensory Neurons in the *Drosophila* Genital Tract Regulate Female Reproductive Behavior // *Neuron*. II 2009. 61, 4. 511–518.
- Inagaki Hidehiko K, Jung Yonil, Hoopfer Eric D, Wong Allan M, Mishra Neeli, Lin John Y, Tsien Roger Y, Anderson David J.* Optogenetic control of *Drosophila* using a red-shifted channelrhodopsin reveals experience-dependent influences on courtship // *Nature Methods*. III 2014. 11, 3. 325–332.
- Isaac R. Elwyn, Li Chenxi, Leedale Amy E., Shirras Alan D.* *Drosophila* male sex peptide inhibits siesta sleep and promotes locomotor activity in the post-mated female // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. I 2010. 277, 1678. 65–70.
- Ito C., Goto S. G., Shiga S., Tomioka K., Numata H.* Peripheral circadian clock for the cuticle deposition rhythm in *Drosophila melanogaster* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. VI 2008. 105, 24. 8446–8451.

- Jagota Anita, Iglesia Horacio O. de la, Schwartz William J.* Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro // *Nature Neuroscience*. IV 2000. 3, 4. 372–376.
- Jaumouillé Edouard, Koch Rafael, Nagoshi Emi.* Uncovering the Roles of Clocks and Neural Transmission in the Resilience of *Drosophila* Circadian Network // *Frontiers in Physiology*. V 2021. 12. 663339.
- Kaneko Maki, Hall Jeffrey C.* Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: Transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections // *The Journal of Comparative Neurology*. VI 2000. 422, 1. 66–94.
- Kaneko Maki, Helfrich-Förster Charlotte, Hall Jeffrey C.* Spatial and Temporal Expression of the period and timeless Genes in the Developing Nervous System of *Drosophila*: Newly Identified Pacemaker Candidates and Novel Features of Clock Gene Product Cycling // *The Journal of Neuroscience*. IX 1997. 17, 17. 6745–6760.
- Klapoetke Nathan C, Murata Yasunobu, Kim Sung Soo, Pulver Stefan R, Birdsey-Benson Amanda, Cho Yong Ku, Morimoto Tania K, Chuong Amy S, Carpenter Eric J, Tian Zhijian, Wang Jun, Xie Yinlong, Yan Zhixiang, Zhang Yong, Chow Brian Y, Surek Barbara, Melkonian Michael, Jayaraman Vivek, Constantine-Paton Martha, Wong Gan Ka-Shu, Boyden Edward S.* Independent optical excitation of distinct neural populations // *Nature Methods*. III 2014. 11, 3. 338–346.
- Ko Caroline H., Takahashi Joseph S.* Molecular components of the mammalian circadian clock // *Human Molecular Genetics*. X 2006. 15, suppl.2. R271–R277.
- Kumar Vinod.* Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour. New Delhi: Springer India, IV 2017. 321–322.
- Kunst Michael, Hughes Michael E., Raccuglia Davide, Felix Mario, Li Michael, Barnett Gregory, Duah Janelle, Nitabach Michael N.* Calcitonin Gene-Related Peptide Neurons Mediate Sleep-Specific Circadian Output in *Drosophila* // *Current Biology*. XI 2014. 24, 22. 2652–2664.
- Lin Y.* The Neuropeptide Pigment-Dispersing Factor Coordinates Pacemaker Interactions in the *Drosophila* Circadian System // *Journal of Neuroscience*. IX 2004. 24, 36. 7951–7957.
- Lowrey Phillip L., Takahashi Joseph S.* MAMMALIAN CIRCADIAN BIOLOGY: Elucidating Genome-Wide Levels of Temporal Organization // *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. IX 2004. 5, 1. 407–441.
- Meireles-Filho Antonio C.A., Bardet Anaïs F., Yáñez-Cuna J. Omar, Stampfel Gerald, Stark Alexander.* cis -Regulatory Requirements for Tissue-Specific Programs of the Circadian Clock // *Current Biology*. I 2014. 24, 1. 1–10.
- Muraro N.I., Pérez N., Ceriani M.F.* The circadian system: Plasticity at many levels // *Neuroscience*. IX 2013. 247. 280–293.
- Paoletti Pierre, Ellis-Davies Graham C. R., Mourot Alexandre.* Optical control of neuronal ion channels and receptors // *Nature Reviews Neuroscience*. IX 2019. 20, 9. 514–532.
- Park Jae H.* Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila* // *PNAS*. III 2000. 97, 7. 6.

- Peng Jing, Zipperlen Peder, Kubli Eric.* Drosophila Sex-Peptide Stimulates Female Innate Immune System after Mating via the Toll and Imd Pathways // *Current Biology*. IX 2005. 15, 18. 1690–1694.
- Peng Ying, Stoleru Dan, Levine Joel D, Hall Jeffrey C, Rosbash Michael.* Drosophila Free-Running Rhythms Require Intercellular Communication // *PLoS Biology*. IX 2003. 1, 1. e13.
- Pfeiffenberger Cory, Lear Bridget C., Keegan Kevin P., Allada Ravi.* Processing Sleep Data Created with the *Drosophila* Activity Monitoring (DAM) System: Figure 1. // *Cold Spring Harbor Protocols*. XI 2010. 2010, 11. pdb.prot5520.
- Plautz Jeffrey D., Kaneko Maki, Hall Jeffrey C., Kay Steve A.* Independent Photoreceptive Circadian Clocks Throughout *Drosophila* // *Science*. XI 1997. 278, 5343. 1632–1635.
- Renn Susan C.P, Park Jae H, Rosbash Michael, Hall Jeffrey C, Taghert Paul H.* A pdf Neuropeptide Gene Mutation and Ablation of PDF Neurons Each Cause Severe Abnormalities of Behavioral Circadian Rhythms in *Drosophila* // *Cell*. XII 1999. 99, 7. 791–802.
- Rezával Carolina, Pavlou Hania J., Dornan Anthony J., Chan Yick-Bun, Kravitz Edward A., Goodwin Stephen F.* Neural Circuitry Underlying *Drosophila* Female Postmating Behavioral Responses // *Current Biology*. VII 2012. 22, 13. 1155–1165.
- Ribeiro Carlos, Dickson Barry J.* Sex Peptide Receptor and Neuronal TOR/S6K Signaling Modulate Nutrient Balancing in *Drosophila* // *Current Biology*. VI 2010. 20, 11. 1000–1005.
- Salcedo Ernesto, Huber Armin, Henrich Stefan, Chadwell Linda V., Chou Wen-Hai, Paulsen Reinhard, Britt Steven G.* Blue- and Green-Absorbing Visual Pigments of *Drosophila* : Ectopic Expression and Physiological Characterization of the R8 Photoreceptor Cell-Specific Rh5 and Rh6 Rhodopsins // *The Journal of Neuroscience*. XII 1999. 19, 24. 10716–10726.
- Seki Takaharu, Isono Kunio, Ozaki Kaoru, Tsukahara Yasuo, Shibata-Katsuta Yuko, Ito Masayoshi, Irie Toshiaki, Katagiri Masanao.* The metabolic pathway of visual pigment chromophore formation in *Drosophila melanogaster* // *Eur. J. Biochem*. 1998. 6.
- Shafer Orié Thomas, Helfrich-Förster Charlotte, Renn Susan Christine Portia, Taghert Paul H.* Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes // *The Journal of Comparative Neurology*. IX 2006. 498, 2. 180–193.
- Sharkey Camilla R., Blanco Jorge, Leibowitz Maya M., Pinto-Benito Daniel, Wardill Trevor J.* The spectral sensitivity of *Drosophila* photoreceptors // *Scientific Reports*. XII 2020. 10, 1. 18242.
- Simpson Julie H, Looger Loren L.* Functional Imaging and Optogenetics in *Drosophila* // *Genetics*. IV 2018. 208, 4. 1291–1309.
- Stoleru Dan, Peng Ying, Agosto José, Rosbash Michael.* Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila* // *Nature*. X 2004. 431, 7010. 862–868.
- Wald George.* Molecular Basis of Visual Excitation // *Science*. X 1968. 162. 10.
- Wen Yang, Zhou Wei, Zhu Xinxin, Cheng Shuting, Xiao Guoguang, Li Yiyuan, Zhu Yu, Wang Zhengrong, Wan Chaomin.* An investigation of circadian rhythm in *Escherichia coli* // *Biological Rhythm Research*. IX 2015. 46, 5. 753–762.

- Yang Chung-hui, Rumpf Sebastian, Xiang Yang, Gordon Michael D., Song Wei, Jan Lily Y., Jan Yuh-Nung.* Control of the Postmating Behavioral Switch in *Drosophila* Females by Internal Sensory Neurons // *Neuron*. II 2009. 61, 4. 519–526.
- Yao Z., Shafer O. T.* The *Drosophila* Circadian Clock Is a Variably Coupled Network of Multiple Peptidergic Units // *Science*. III 2014. 343, 6178. 1516–1520.
- Yoshii Taishi, Funada Yuriko, Ibuki-Ishibashi Tadashi, Matsumoto Akira, Tanimura Teiichi, Tomioka Kenji.* *Drosophila* cryb mutation reveals two circadian clocks that drive locomotor rhythm and have different responsiveness to light // *Journal of Insect Physiology*. VI 2004. 50, 6. 479–488.
- Zhang Luoying, Chung Brian Y., Lear Bridget C., Kilman Valerie L., Liu Yixiao, Mahesh Guruswamy, Meissner Rose-Anne, Hardin Paul E., Allada Ravi.* DN1p Circadian Neurons Coordinate Acute Light and PDF Inputs to Produce Robust Daily Behavior in *Drosophila* // *Current Biology*. IV 2010a. 20, 7. 591–599.
- Zhang Yong, Liu Yixiao, Bilodeau-Wentworth Diana, Hardin Paul E., Emery Patrick.* Light and Temperature Control the Contribution of Specific DN1 Neurons to *Drosophila* Circadian Behavior // *Current Biology*. IV 2010b. 20, 7. 600–605.
- Özkaya Özge, Rosato Ezio.* The Circadian Clock of the Fly: A Neurogenetics Journey Through Time // *Advances in Genetics*. 77. 2012. 79–123.