

Activación de las neuronas *ppk+* tras el
apareamiento y su rol en la regulación
de la actividad locomotora en
Drosophila melanogaster

Trabajo final para optar por el título de Licenciada en Ciencias Biológicas



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

Alumna: Maria Trinidad Breide
Directora: Diana Lorena Franco

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

Noviembre 2022

RESUMEN

Las hembras de *Drosophila* sufren cambios en el comportamiento luego del apareamiento. Al conjunto de estos cambios se los llama respuestas de post-cópula (PMR *post-mating responses*). Recientemente datos de nuestro laboratorio muestran que las hembras apareadas pierden la capacidad de anticipar las transiciones noche-día. Esta respuesta de post-cópula se encuentra mediada por la acción del SP (péptido sexual) en las neuronas *ppk+*, ya que reducir la expresión del SPR (receptor del péptido sexual) en estas neuronas, restablece la capacidad de anticipar la transición noche-día en hembras apareadas.

La actividad anticipatoria de la mañana, es un comportamiento regulado por el reloj circadiano. Las neuronas laterales ventrales pequeñas (s-LNv), también conocidas por expresar el neuropéptido PDF (LNvs), son las encargadas de regular el pico de actividad de la mañana. Resultados de nuestro laboratorio muestran que las neuronas *ppk+* establecen contactos post-sinápticos con las neuronas *pdf+*.

En el presente trabajo se analizó el rol de la actividad de las neuronas *ppk+* en la regulación de dos respuestas de post-cópula como son la anticipación de la mañana y la pérdida de sueño diurno. Para ello, implementamos dos técnicas de modulación de la actividad neuronal; una crónica a lo largo de todo el desarrollo y la otra aguda, que permite controlar de manera reversible y adulto-específica la actividad neuronal. Los resultados obtenidos muestran que el silenciamiento de las neuronas *ppk+* en hembras apareadas recupera la anticipación de la mañana, mientras que su activación en hembras vírgenes aumenta la actividad general de las moscas eliminando su capacidad de anticipar la mañana. Con respecto a la modulación del sueño diurno observamos que el silenciamiento de las neuronas *ppk+* no produjo ningún cambio significativo en hembras apareadas, mientras que la activación de las neuronas *ppk+* en hembras vírgenes generó una pérdida de sueño diurno equivalente al que normalmente se observa en hembras apareadas. Finalmente, con el objetivo de identificar la naturaleza neuroquímica de las neuronas *ppk+*, realizamos un *screen* utilizando interferencias de RNA para distintos neurotransmisores, lo que nos permitió identificar la naturaleza colinérgica de las neuronas *ppk+*, y su relevancia en la disminución del sueño diurno en hembras apareadas, fortaleciendo la idea de una conexión funcional entre las neuronas encargadas de transmitir el estado de apareamiento y el reloj circadiano.

ABSTRACT

After mating, the physiology and the behavior of *Drosophila* females undergoes several important changes; these changes are known as post-mating responses (PMR). Recently, data from our laboratory shows that mated females lose their ability to anticipate the night-day transition. This post-mating response is mediated by the action of SP (sex peptide) in *ppk+* neurons, because reducing the expression of sex peptide receptor (SPR) in these neurons restores the ability to anticipate the night-day transition in mated females. Morning anticipation is a feature regulated by the circadian clock. Pigment-dispersing factor (PDF)-positive ventral lateral neurons (sLN_v) play a central role regulating the morning activity peak. Results from our laboratory show that the *ppk+* neurons establish post-synaptic contacts with the *pdf+* neurons (LN_vs).

In the present work we analyze the role of the activity of *ppk+* neurons in the regulation of morning anticipation and day time sleep in mated females. We implemented two techniques to modulate neuronal activity; one chronic throughout development and the other one acute, which allows reversible and adult-specific control of neuronal activity. The results obtained show that the silencing of *ppk+* neurons in mated females recovers morning anticipation, while its activation in virgin females increases the general activity of the flies, suppressing their ability to anticipate. Regarding the modulation of diurnal sleep, we observed that the silencing of *ppk+* neurons did not produce any significant change in mated females, while the activation of *ppk+* in virgin females generated a loss of daytime sleep equivalent to that normally observed in mated females. Finally, in order to identify the neurochemical nature of *ppk+* neurons, we performed a screen using RNA interference for different neurotransmitters which allowed us to identify the cholinergic nature of *ppk+* neurons and their relevance in the control of day time sleep in mated females, strengthening the idea of a functional connection between neurons responsible for transmitting the state of mating and the circadian clock.,

Palabra claves: ritmos circadianos, apareamiento, anticipación de la mañana, termogénica, sueño diurno.

Key words: circadian rhythm, mating, morning anticipation, thermogenetic, daytime sleep.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	5
1.1	El sistema circadiano	6
1.2	El origen genético del reloj: <i>Drosophila</i> un elemento clave.....	7
1.3	El reloj molecular	8
1.4	Red Neuronal Circadiana en <i>Drosophila</i>	10
1.5	Actividad locomotora rítmica en <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.6	Comportamientos de post-cópula	12
2	OBJETIVOS	16
2.1	Analizar el rol de la actividad de las neuronas <i>ppk+</i> en el control de la actividad locomotora en hembras de <i>Drosophila melanogaster</i>	16
2.2	Identificar la naturaleza neuroquímica de las neuronas <i>ppk+</i>	16
3	MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1	Sistema GAL4-UAS:.....	17
3.2	Mantenimiento de las líneas utilizadas:	17
3.3	Nomenclatura de <i>Drosophila</i>	18
3.4	Líneas Utilizadas:.....	19
3.5	Termo-genética:.....	20
3.6	Registro de la actividad locomotora por sistema de video:.....	21
3.7	Análisis Estadístico:	23
4	RESULTADOS	24
4.1	Inhibición crónica de las neuronas <i>ppk+</i> en hembras apareadas.....	24
4.2	Inhibición aguda de las neuronas <i>ppk+</i> en hembras apareadas.....	26
4.3	Activación crónica de las neuronas <i>ppk+</i> en hembras vírgenes.....	30
4.4	Activación aguda de las neuronas <i>ppk+</i> en hembras vírgenes.....	30
4.5	Neurotransmisores liberados por las neuronas <i>ppk+</i>	32
5	DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	38
5.1	El silenciamiento crónico de las neuronas <i>ppk+</i> en hembras apareadas recupera la anticipación de la mañana.	38
5.2	El silenciamiento agudo de las neuronas <i>ppk+</i> en hembras apareadas no muestra efectos en los patrones de actividad y sueño.....	41
5.3	La activación aguda de las neuronas <i>ppk+</i> disminuye el índice de anticipación de la mañana.....	42
5.4	Naturaleza química de de las neuronas <i>ppk+</i> : Acetilcolina como modulador del sueño dependiente del estado de apareamiento.	43
5.5	CONCLUSIÓN FINAL.....	45
6	AGRADECIMIENTOS	45
7	BIBLIOGRAFÍA	46

1 INTRODUCCIÓN

Vivimos en un mundo que da una vuelta completa sobre su eje cada 24 hs. Esto causa cambios en el ambiente, siendo el más evidente los cambios entre el día y la noche. Estos cambios periódicos han dejado en los organismos una huella en su evolución. Es así que la mayoría de los organismos desde bacterias a mamíferos manifiestan cambios fisiológicos y metabólicos a lo largo del día de manera rítmica. Cuando estos ritmos poseen un período cercano a las 24hs se dice que estamos ante un ritmo circadiano (del latín *circa*=cerca y *diem*=día, cercano al día). Una característica distintiva de estos ritmos es que, si bien pueden ser sincronizados por claves externas, deben persistir con un período cercano a 24hs aún en ausencia de estas.

Aunque las observaciones de fenómenos periódicos en la naturaleza son muy antiguas, el primer experimento que sugería la presencia de un reloj biológico endógeno con un período cercano a 24 hs capaz de persistir bajo condiciones constantes, fue realizado en 1729 por el científico francés Jean-Jacques d'Ortous de Mairan, quien describió el movimiento circadiano de las hojas de la planta *Mimosa púdica*. De Mairan observó que las hojas se mantenían extendidas durante el día y se retraían durante la noche, lo cual podía explicarse en función del uso de la luz como fuente de energía. Pero De Mairan fue un paso más allá realizando un experimento en el cual colocó una planta dentro de un gabinete donde no llegaba la luz solar y observó que las hojas seguían en movimiento, demostrando así que el movimiento de las hojas persistía en oscuridad constante, sugiriendo la existencia de un reloj endógeno (Figura 1A) (Touitou & Haus, 1992).

Esta observación fue luego utilizada por el botánico sueco Carlos Linneo en 1745 para diseñar un reloj floral publicado en "Philosophia botanica" (1751). Linneo observó que ciertas plantas abrían y cerraban sus flores en distintos momentos del día. Utilizando este conocimiento confeccionó un reloj con el cual uno era capaz de saber la hora del día (entre las 6hs y las 18hs) de acuerdo a que flores se encontraban abiertas o cerradas. (Figura 1B). Pese a algunos esfuerzos por abordar esta idea de los ritmos endógenos, la falta de herramientas genéticas y moleculares, que permitieran identificar el mecanismo responsable de generar estos ritmos, hizo que fuera muy poco lo que se avanzó en esta idea hasta mediados del siglo XX.



Figura 1: A) Esquema del experimento realizado por Jean-Jacque de Mairan's sobre el movimiento de las hojas de la planta *Mimosa* sp. B) Esquema del reloj floral de Linneo.

1.1 El sistema circadiano

Los sistemas circadianos consisten básicamente de tres partes: las vías de entrada (*inputs* o *zeitgebers* como por ejemplo, luz, temperatura, etc), a través de las cuales llega información del ambiente; el oscilador central (reloj molecular) encargado de marcar el paso del tiempo, mantener el ritmo y establecer el período interno; y las vías de salida (*outputs*) que reciben información del oscilador central y controlan cambios fisiológicos, metabólicos y comportamentales (Figura 2) (Yu & Hardin, 2006, Muraro & Ceriani, 2014).

En *Drosophila*, la principal clave sincronizadora es la luz, aunque también los ciclos de alta y baja temperatura (Glaser & Stanewsky, 2007) y la actividad social (Eban-Rothschild & Bloch, 2012), funcionan como *zeitgebers*.

El oscilador central reside en un grupo de neuronas del sistema nervioso central que funciona como marcapasos, comandando el ritmo endógeno del individuo y sincronizando la actividad de osciladores periféricos subordinados en distintos tejidos (Hall, 2005; Reppert & Weaver, 2001). En *Drosophila* el oscilador central está constituido por un grupo de 150 neuronas, también llamadas neuronas relojeras. En estas neuronas tiene lugar la expresión oscilatoria de ciertos genes, que son los responsables de generar y mantener el período endógeno.

Las vías de salida desde el oscilador central incluyen procesos biológicos de distinto grado de complejidad que van desde el control de expresión de genes de segundo orden por parte de componentes canónicos del reloj, hasta la modulación de señales eléctricas, endócrinas y metabólicas que impactan en la fisiología de tejidos periféricos. Por medio

de estas vías de salida, el reloj circadiano modula procesos como los ciclos de actividad y reposo, temperatura corporal, síntesis y liberación de hormonas, habilidad cognitiva, entre otros.

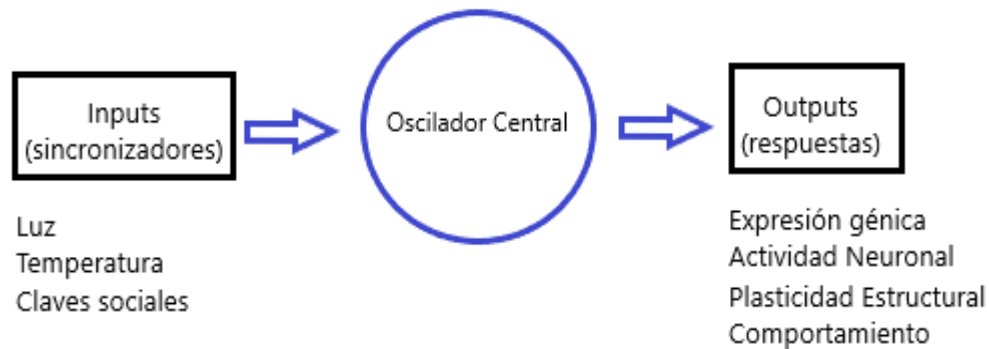


Figura 2: Esquema del sistema circadiano

1.2 El origen genético del reloj: *Drosophila* un elemento clave

El origen genético del reloj circadiano fue por primera vez caracterizado por el científico Bunning en 1935 (Bunning, 1935). Bunning observó que el movimiento del tallo y las hojas de dos plantas de frijoles (*Phaseolus*) genéticamente distintas, mostraban períodos distintos de 23 hs y 27 hs respectivamente. Realizando experimentos de hibridación, Bunning obtuvo plantas con un período intermedio al de los parentales 25hs. Este experimento demostró que las características de los ritmos biológicos son transmitidas genéticamente de generación en generación.

Años más tarde, a finales de la década del 60, Konopka y Benzer, revolucionaron el campo de la genética del comportamiento utilizando a *Drosophila* como modelo. En su primer trabajo, estudiando la eclosión del puparío de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, identificaron un mutante con período más largo, otro con más período corto y uno que no mostraba ningún ritmo de eclosión. Usando estas moscas mutantes, y mediante técnicas de complementación génica, encontraron que todas las mutaciones afectaban la función del mismo gen, al que llamaron *period (per)* (Konopka & Benzer, 1971).

No obstante, no fue hasta la década del 90 cuando el rápido progreso en el campo de los ritmos circadianos permitió la identificación de otros genes involucrados en generar las oscilaciones circadianas a nivel molecular como *timeless (tim)*, *clock (Clk)*, *cycle (cyc)*,

doubletime (dbt), *vri*, *clockwork orange (cwo)*, and *PAR domain protein 1ε (pdp1ε)*. (Allada et al., 1998; Blau and Young, 1999; Kadener et al., 2007; Price et al., 1998; Rutila et al., 1998; Sehgal et al., 1994, 1995; Vosshall et al., 1994).

1.3 El reloj molecular

El avance en la identificación de genes que componen el reloj, permitió dar forma al mecanismo molecular del oscilador, el cual como mencionamos anteriormente es fundamental para generar y mantener los ritmos circadianos. Hoy en día se sabe que el 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 dos ciclos de transcripción de retroalimentación negativa que se encuentran interconectados y controlan la expresión génica a través de sus propios productos proteicos (P. E. Hardin et al., 1990, Darlington 1998). Mientras que las modificaciones postraduccionales realizan el control fino de la estabilidad y localización subcelular de las proteínas canónicas del reloj (Ozkaya & Rosato, 2012).

En los trabajos que estudian los ritmos circadianos (cronobiológicos), la medición del tiempo está representada en ZT (*Zeitgeber time*), y hace referencia a las horas transcurridas desde la última transición luz-oscuridad. El primer ciclo inicia cuando el heterodímero CLK/CYC se une a la secuencia E-box presente en los genes *per* y *tim* desencadenando su transcripción y traducción la cual alcanza su máximo al inicio de la noche (ZT14-16). Sin embargo, las proteínas no se acumulan debido a la fosforilación de PER vía DOUBLETIME (DBT) que lleva a la ubiquitinación y degradación mediada por la E3 ligasa SUPERNUMERARY LIMBS (SLIMB); y a la unión durante el día de CRY a TIM que dirige su fosforilación, promoviendo su degradación vía proteasoma. En ausencia de luz, TIM se acumula uniéndose a PER, promoviendo su estabilización. Hacia la mitad de la noche se alcanzan niveles de PER y TIM tales que, permiten que, el complejo PER-TIM-DBT transloque al núcleo, en un proceso dependiente de la fosforilación por SHAGGY (SGG). Una vez en el núcleo, el complejo PER-TIM, o sólo PER, se une a CLK impidiendo la acción activadora del heterodímero, y por ende reprimiendo su propia transcripción. Este ciclo finaliza al comenzar el día cuando la presencia de luz determina la degradación de TIM mediada por CRY (Figura 3A) (Paul E. Hardin, 2011).

El segundo ciclo interconectado con el primero se encarga del ciclado de CLOCK. En este, la unión del complejo CLK/CYC a la secuencia del E-box desencadena la transcripción de los genes *vri* y *Par domain protein 1 (pdp1)* (Blau and Young, 1999;

Cyran et al., 2003), dos reguladores transcripcionales cuyos productos se unen al promotor de *Clk* pero que poseen funciones opuestas; por un lado, VRI inhibe la transcripción

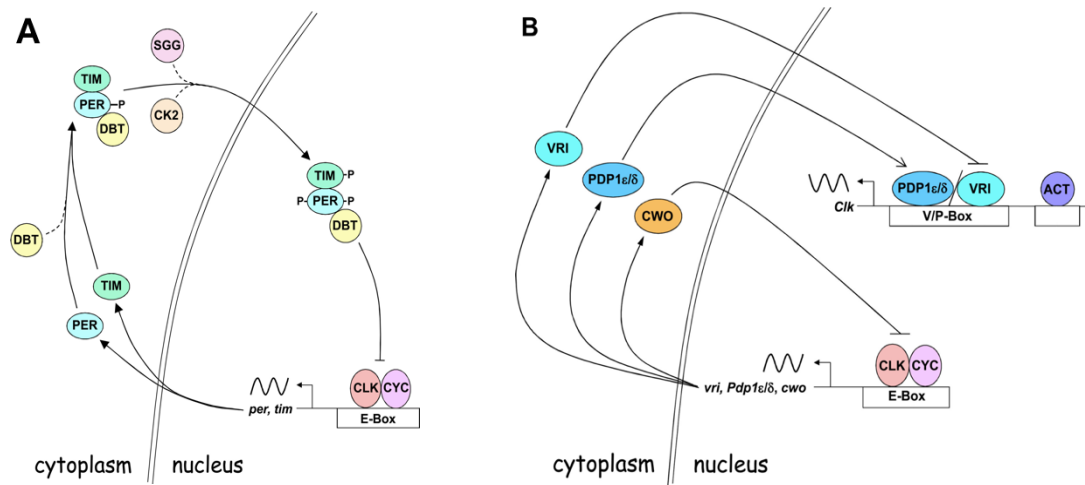


Figura 3: A) Primer ciclo de retroalimentación negativa, expresión-represión del dímero PER-TIM. B) Segundo ciclo de retroalimentación negativa, expresión-represión del dímero CLOCK-CYC. Imágenes tomadas de Paul E. Hardin, 2011.

y PDP1 la promueve (Figura 3B). VRI se acumula en fase con su ARNm teniendo su pico en ZT14 (mitad de la noche). A medida que los niveles de VRI aumentan éste se une a la secuencia promotora de *Clk* denominada VRI-PDP1-Box (V/P-BOX) inhibiendo su transcripción (Cyran et al., 2003; Glossop et al., 2003). Alrededor de ZT16-ZT4 la unión de PER-DBT-TIM al complejo CLK/CYC no sólo inhibe la transcripción de *per* y *tim* sino también de *vri* y *pdp1*, por lo que los niveles de VRI comienzan a bajar. En ese momento la proteína PDP1, que no se acumula en fase con su ARNm, y tiene su pico de mayor abundancia cerca de ZT 18, varias horas más tarde que VRI, se une a la secuencia V/P-box activando la transcripción del *Clk*. De esta manera la acumulación de los niveles de *Clk* sucede en antifase con los niveles de *Per* y *Tim*. Finalmente, la degradación de PER libera al complejo CLK/CYC de su inhibición, y comienza un nuevo ciclo de transcripción de *per*, *tim*, *vri* y *pdp1*. (Hardin, 2011).

Como podemos ver el correcto ritmo del reloj molecular depende de un fino control de los niveles de transcripción, estabilidad de mensajero, niveles de fosforilación, formación de complejos proteicos y cambios de localización subcelular (Ozkaya & Rosato, 2012).

1.4 Red neuronal circadiana en *Drosophila*

En la actualidad se conocen 150 neuronas ubicadas en el cerebro adulto de *Drosophila* que expresan PER y TIM. Estas se denominan neuronas relojeras, y en conjunto definen el circuito circadiano. Han sido clasificadas en grupos y subgrupos basándose principalmente en su distribución anatómica y en su tamaño. A grandes rasgos se definen dos grandes grupos, las neuronas dorsales (en inglés *Dorsal Neurons* DN_s) y las neuronas laterales (en inglés *Lateral Neurons* LN_s). Las neuronas dorsales se dividen a su vez en tres subgrupos, las DN₁s (16 neuronas) que se dividen a su vez en dos grupos, anterior (DN_{1a}) y posterior (DN_{1p}), las DN₂s (2 neuronas) y las DN₃s (40 neuronas aproximadamente). Las neuronas laterales por su parte han sido divididas en 4 grupos, las neuronas laterales dorsales (en inglés *Dorsal Lateral Neurons* LN_d) conformado por 6 neuronas, las neuronas laterales posteriores (en inglés *Posterior Lateral Neurons* LN_p) (3 neuronas) y 9 neuronas laterales ventrales (en inglés *Ventral Lateral Neurons* LN_vs); estas a su vez se subdividen en dos grupos según su tamaño: en 4 neuronas grandes que forman las neuronas laterales ventrales grandes (en inglés *Large Ventral Lateral Neurons* l-LN_vs) y 5 neuronas laterales ventrales pequeñas (en inglés *Small Ventral Lateral Neurons* s-LN_vs). Las LN_vs, también son conocidas como neuronas *pdf*⁺ puesto que expresan el neuropéptido PDF (*Pigment Dispersing Factor*), a excepción de una de las neuronas pequeñas que se la conoce por la 5 s-LN_vs. (Kaneko & Hall, 2000, Helfrich-Förster et al., 2007) (Figura 4). Es importante destacar que cada una de las neuronas dentro de los distintos grupos puede no ser funcionalmente idéntica, ya que pueden recibir o liberar distintos neurotransmisores o neuropéptidos (Figura 5) (Muraro et al., 2013).

La actividad conjunta de la red circadiana define el comportamiento rítmico robusto pero plástico de la actividad. Los distintos subgrupos neuronales cumplen funciones más o menos específicas dentro del patrón rítmico de actividad locomotora a lo largo de los distintos momentos del día y bajo condiciones ambientales determinadas.

En este sentido las DN₂ y las LPN están involucradas en el entrenamiento por temperatura, un subgrupo de las DN₁ en integrar tanto información lumínica como térmica (Yoshii et al. 2005; Miyasako et al. 2007), las LN_d y la 5^{ta} s-LN_v (PDF⁻) controlarían la actividad locomotora durante el atardecer, mientras que las s-LN_vs controlarían la actividad locomotora rítmica durante el amanecer (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004).

Sin embargo, en condiciones de oscuridad constante (OO) existe una diferenciación jerárquica entre los grupos de neuronas relojeras, siendo las LNvs las responsables de la correcta sincronización del marcapasos central (Lin et al., 2004).

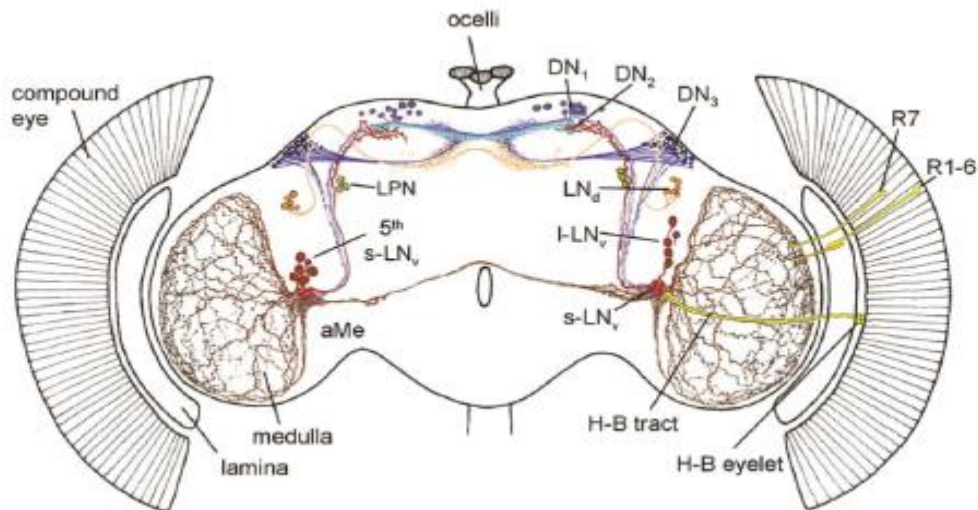


Figura 4: Esquema del cerebro de una mosca adulta, con la ubicación de las neuronas reloj, sus somas y proyecciones. Imagen tomada de Helfrich-Förster (2007).

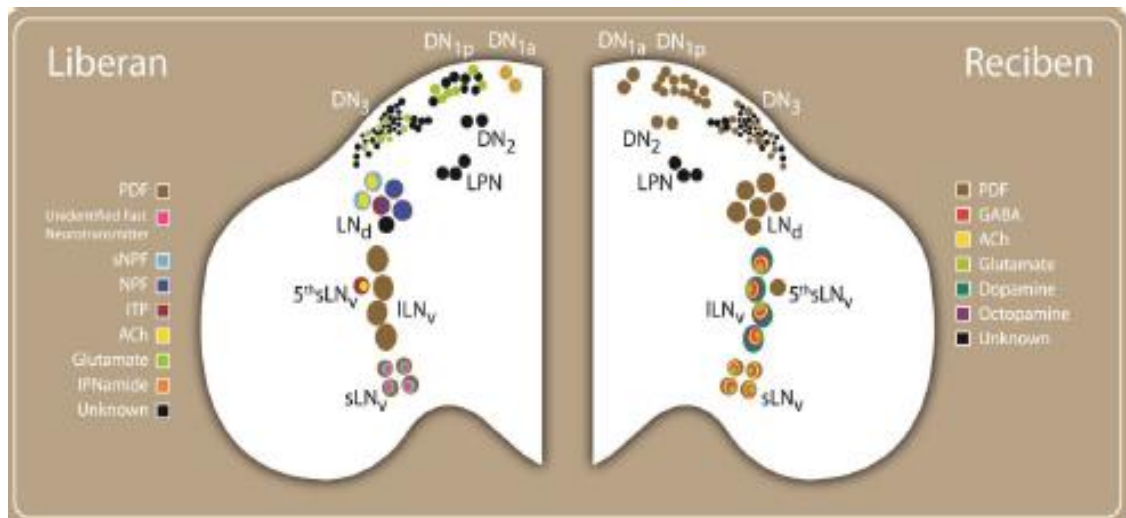


Figura 5: Caracterización neuroquímica de las neuronas del circuito circadiano. En el panel izquierdo los neurotransmisores/ neuropéptidos liberados por cada grupo de neuronas. Del lado derecho los neurotransmisores que reciben. Imagen toma de Muraro et al. (2013).

1.5 Actividad locomotora rítmica en *Drosophila melanogaster*

Drosophila es uno de los organismos más ampliamente utilizado para el estudio del reloj circadiano, ya que presenta una serie de ventajas entre las cuales se destacan que su genoma este completamente secuenciado y la amplia disponibilidad de herramientas de manipulación genética, su corto ciclo de vida (10 días a 25 °C), su fácil mantenimiento y

uno de los más importantes la capacidad de desarrollar comportamientos complejos, entre ellos la actividad locomotora circadiana.

Drosophila presenta un comportamiento crepuscular, caracterizado por dos picos de actividad alrededor de las transiciones luz-oscuridad, denominados pico de la tarde (en inglés *evening peak*) durante la transición día-noche y el pico de la mañana (en inglés *morning peak*) durante el cambio noche-día seguidos de una disminución de la actividad durante el día (siesta) y la noche (sueño nocturno) (Figura 6). La anticipación a estos cambios de fase es uno de los comportamientos bajo condiciones de luz-oscuridad controlado por el reloj (Grima et al., 2004). El hecho de que el aumento de la actividad suceda justo antes del cambio de fase permite descartar efectos de enmascaramiento dados por la luz (Chang, 2006).

Tradicionalmente, se han propuesto dos osciladores distintos responsables de controlar cada pico de actividad: un oscilador M (en inglés *Morning*) conformado por las s-LNVs, responsable de controlar la anticipación y el pico de actividad de la mañana y un oscilador E (en inglés *Evening*) encargado de generar la anticipación y el pico de actividad de la tarde, donde participarían las LNDs, las DN1 y la 5^{ta} s-LNVs (PDF negativa) (Heldrich-Förster 2000, Grima et al., 2004). Actualmente se entiende que desarrollo del patrón locomotor no estaría únicamente restringido a las funciones del oscilador M o E, sino que dependería de un sistema más complejo de regulación, donde existen ciclos de retroalimentación negativa entre las células del M y E, cambios diarios en la conectividad entre estos grupos y la participación de otros grupos neuronales dependiendo de las condiciones ambientales (Menegazzi et al., 2020, Duhart et al., 2020, Gorostiza et al., 2014).

1.6 Comportamientos de post-cópula

En *Drosophila*, como en muchos otros organismos, el apareamiento desencadena numerosos cambios en el comportamiento que son esenciales para el éxito reproductivo.

Existe un conjunto de comportamientos descritos en *Drosophila* que cambian tras el apareamiento, como la receptividad de las hembras al macho, la tasa de puesta de huevos, la arquitectura del sueño, las preferencias en la dieta, etc (Liu and Kubli, 2003; Isaac et al, 2010. Ribeiro & Dickson, 2010; J. Peng et al., 2005). Estos cambios se llaman respuestas de post-cópula y están inducidos principalmente por un péptido, denominado Péptido Sexual (*Sex peptide* SP), producido por la glándula accesoria de los machos, que es transferido a las hembras junto con el líquido seminal durante la cópula (Chen et al., 1988;

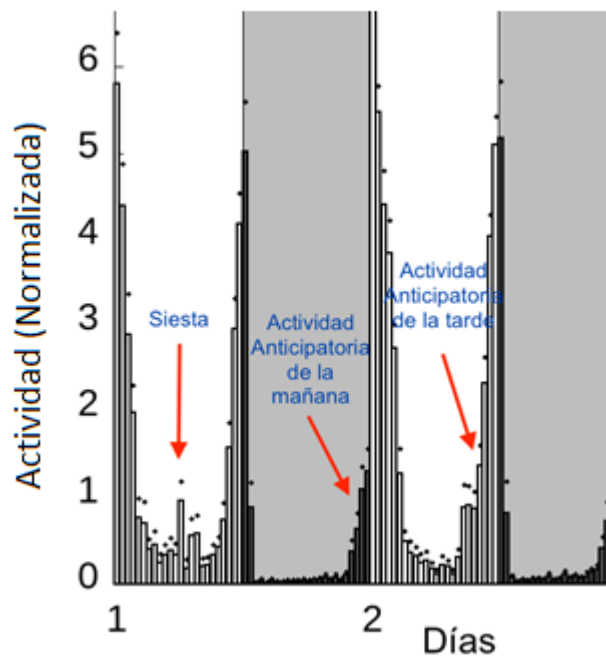


Figura 6: Patrón locomotor poblacional de machos de *Drosophila melanogaster*. Se muestra la actividad normalizada para una población de 23 individuos en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, indicados por las barras blancas y negras respectivamente.

Chapman et al., 2003, H. Liu & Kubli, 2003). Recientemente se ha identificado un receptor acoplado a proteína G llamado Receptor del Péptido Sexual (*Sex peptide Receptor* SPR), fundamental para que se desencadenen las respuestas de post-apareamiento en las hembras (Yapici et al., 2008).

La principal vía de señalización del SP es a través de un grupo de 4-6 neuronas sensoriales denominadas SPSN (en inglés *sex peptide sensory neurons*) presentes en el útero, que se caracterizan por la co-expresión de los genes *doublesex* (*dsx*), *fruitless* (*fru*), marcadores que tiene funciones sexo-específicas, y *pickpocket* (*ppk*), un marcador para neuronas nociceptivas (Yang et al., 2009, Häsemeyer et al., 2009, Rezával et al., 2012). Se ha demostrado que las SPSN se contactan con neuronas del ganglio abdominal (*Sex Peptide abdominal ganglion* (SAG)) que son *dsx+* y que estas a su vez proyectan sus terminales al protocerebro dorsal (Feng et al., 2014).

Así mismo, se ha demostrado que la unión del SP inhibe la actividad de las SAG por medio de la inhibición de las SPSN (Figura 7) y que el cambio en la actividad de estas neuronas resulta crítico para que se desencadenen distintas respuestas de post-apareamiento (Feng et al, 2014). Sin embargo, existen evidencias que muestran que el SP es

también capaz de llegar hasta el cerebro a través de la hemolinfa y desencadenar respuestas de post-cópula (Hausmann, et al.,2013).

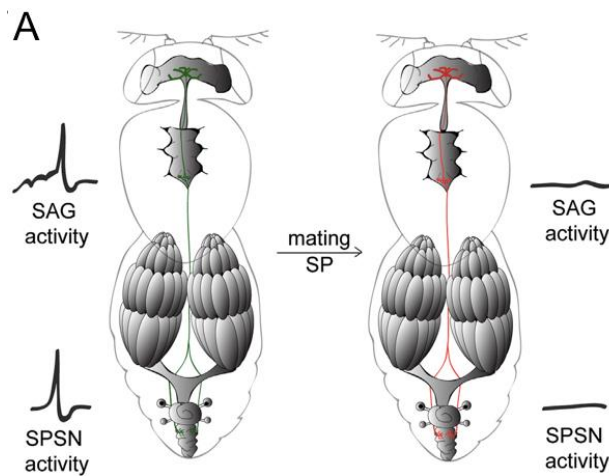


Figura 7: Ilustración esquemática del efecto del SP sobre la actividad neuronal de las SPSN-SAG, tomada de Feng et al 2014.

Como mencionamos anteriormente las moscas, tanto machos como hembras, al menos en el laboratorio, se muestran particularmente activas alrededor del amanecer y del atardecer. Luego del pico de actividad de la tarde se evidencia un comportamiento de tipo sueño (las moscas se encuentran inmóviles por tiempos prolongados durante la noche) en ambos sexos, mientras que la extensión del período de sueño que ocurre entre los picos de la mañana y la tarde, “siesta”, puede variar de acuerdo al sexo, edad de las moscas y del estado de apareamiento. En particular, se ha observado que las hembras apareadas tienen mayor actividad durante el día que las hembras vírgenes y que los machos, reduciendo hasta en un 70% la cantidad de sueño diurno, es decir tienen menos siesta (Isaac et al., 2010; Zimmerman et al., 2012). Esto se ha descrito como un comportamiento post-cópula y se ha observado también en hembras de otra especie de *Drosophila* como *Drosophila suzukii* (Ferguson et al., 2015). Se ha demostrado que la pérdida de la siesta en hembras apareadas está mediada por el SP y que sigue la misma vía de señalización SPSN-SAG, vinculada con otras respuestas de post-cópula (Garbe et al., 2016). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los cambios en el sueño diurno tras el apareamiento no están mediados exclusivamente por el SP, surgiendo la posibilidad de que existan otros mecanismos involucrados (Dove et al., 2017). En conjunto esto indica que si bien la vía de señalización SPSN-SAG parece cumplir un rol principal en la comunicación

del estado de apareamiento, otras neuronas y mecanismos también contribuyen en esta función y en otras respuestas de apareamiento. (Hausmann et al., 2013; Rezával et al., 2012, 2014). El sueño es un parámetro que está regulado no sólo por el reloj circadiano sino también por procesos homeostáticos. Por eso, la reducción del sueño diurno observado en hembras apareadas puede deberse a una interferencia en cualquiera de estos dos procesos.

Son de particular interés en este trabajo las neuronas denominadas *ppk+* que se encuentran innervando el tracto uterino, el ganglio subesofágico y el cerebro. Estas han sido vinculadas con distintas respuestas de post-cópula (Zelle et al., 2013; Yang et al., 2009; Grueber et al., 2007; Hausmann et al., 2013; Häsemeyer et al., 2009; Nallasivan et al., 2021). Las neuronas *ppk+* pertenecen a un grupo de neuronas multidendríticas y como se mencionó anteriormente están principalmente vinculadas a funciones nociceptivas y mecanosensoriales (Adams et al., 1998), recientemente se las ha vinculado también con otras funciones como la neurotransmisión (Zhong et al., 2010; Alvarez de la Rosa et al., 2000).

Resultados obtenidos por nuestro laboratorio, muestran que el apareamiento cambia el comienzo de la actividad diaria de las hembras enmascarando una de las funciones centrales del reloj, que es regular el aumento de actividad antes de la transición noche-día (anticipación de la mañana) (Figura 8). Esta respuesta se encuentra mediada por el SPR principalmente en las neuronas *ppk+*, ya que la disminución de su expresión en estas neuronas restablece la capacidad de anticipar la transición de la mañana en hembras apareadas, teniendo un efecto mayor que la disminución de la expresión del SPR en las neuronas *dsx+* o *fru+*. Más aun, estos resultados previos muestran que las neuronas *ppk+* establecen contactos post-sinápticos con las neuronas *pdf+* (LNvs) las cuales cumplen un rol central en la organización temporal de la actividad. Asimismo, estos resultados muestran que los niveles de PDF se ven disminuidos en hembras apareadas y que éstos se recuperan a niveles parecidos a los presentes en machos cuando se expresa el SPR en las neuronas *ppk+* (Riva et al, 2022).

En resumen, estos resultados indicarían que el reloj es capaz de integrar señales internas, como el estado de apareamiento de las hembras, modificando la organización temporal de los ritmos de actividad, haciendo que estos no sean los mismo antes y después de la cópula.

Teniendo en cuenta los resultados preliminares antes mencionados en el presente trabajo se propone evaluar la hipótesis de que la actividad de las neuronas *ppk+* es la encargada de generar los cambios en el patrón locomotor en las hembras luego del apareamiento.

2 OBJETIVOS

2.1 Analizar el rol de la actividad de las neuronas *ppk+* en el control de la actividad locomotora en hembras de *Drosophila melanogaster*.

Con el objetivo de analizar el rol de la actividad de las neuronas *ppk+* en el control de la actividad locomotora, silenciamos o activamos crónica o agudamente (en el estadio adulto) a estas neuronas, en hembras apareadas y vírgenes, utilizando distintas herramientas genéticas. En particular analizamos el índice de anticipación y la pérdida del sueño aspectos de la actividad que cambian con el apareamiento.

2.2 Identificar la naturaleza neuroquímica de las neuronas *ppk+*

Con el objetivo de identificar mediante qué neurotransmisor las neuronas *ppk+* se comunican con sus blancos post-sinápticos, realizamos de manera constitutiva, es decir durante todo el desarrollo de la mosca, la depleción de distintos transportadores vesiculares de diferentes neurotransmisores empleando interferencias de RNAs tanto en hembras vírgenes como en apareadas y evaluamos su actividad locomotora

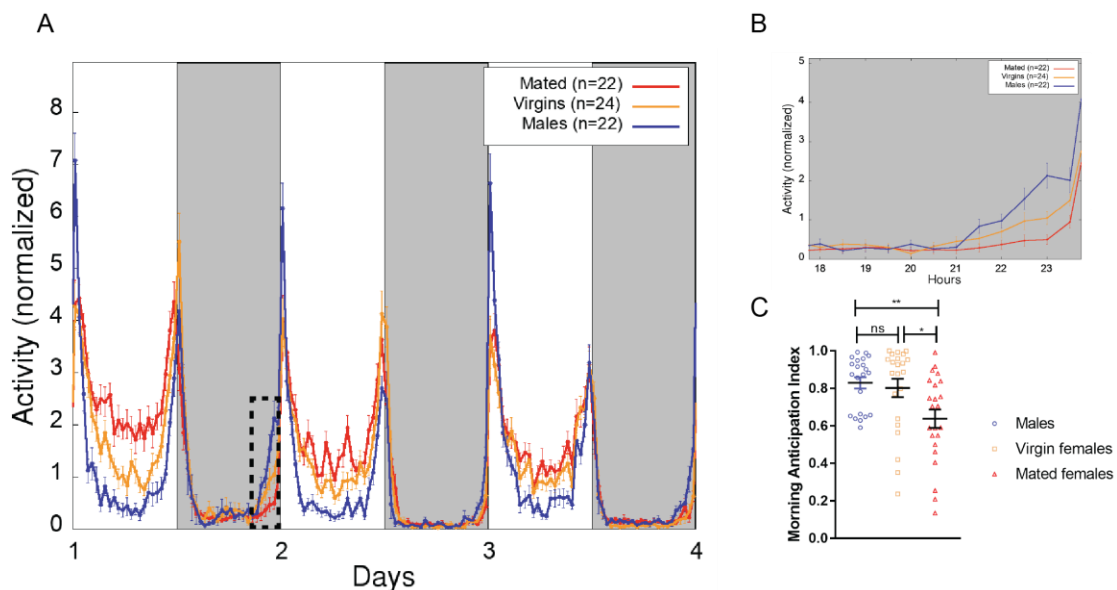


Figura 8: Pérdida de anticipación de la mañana desencadenada por el apareamiento. A) Actividad locomotora normalizada para machos (azul), hembras vírgenes (naranja) y hembras apareadas (rojo). B) Detalle del período encerrado por el cuadrado punteado, que enmarca el momento donde transcurre la actividad anticipatoria de la mañana. C) Cuantificación del índice de anticipación de la mañana.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sistema GAL4-UAS:

El sistema heterólogo GAL4/UAS proveniente de levaduras se utiliza como herramienta para direccionar la expresión de un gen de interés en un tejido determinado (Brand and Perrimon, 1993). La base de este sistema es la afinidad del factor de transcripción GAL4, asociado a un promotor de tejido específico, por la secuencia regulatoria en cis UAS (Upstream Activation Sequence), presente río arriba del gen de interés. Una línea transgénica expresa el GAL4 bajo un promotor específico de tejido (Promotor X), denominada línea inductora, se cruza con otra línea que expresa un gen Y bajo la secuencia UAS (líneas UAS-genY). Luego en la progenie sólo en aquellos individuos que posean ambas construcciones se expresará el gen Y bajo el promotor X (figura 9A). Esto permite activar un gen de interés en numerosos tipos de células y tejidos simplemente cruzando una sola línea que lleva el gen de interés por líneas que expresan el promotor en tejidos distintos. (Brand & Perrimon, 1993).

3.2 Mantenimiento de las líneas utilizadas:

Las líneas utilizadas en este proyecto (detalladas en la Tabla 1), fueron mantenidas en viales de plástico de 2cm de diámetro por 10cm de altura, con medio estándar de maíz (Agar 10gr, Levadura 20gr, Sacarosa 40gr, Polenta 66,5gr, Acido Propionico 4ml, Nipagin 7ml por cada 1 litro de agua), a 25 °C, humedad 60% y ciclos de luz-oscuridad de 12hs:12hs (LO 12 hs:12hs). Para los experimentos en lo que se utilizó la termo-genética, los cruzamientos se realizaron y mantuvieron a 20°C para evitar su activación.

Para todos los experimentos se utilizaron hembras vírgenes de entre 1 y 7 días post-eclosión. Para asegurarse que las hembras no se hayan apareado, estas son separadas de los machos inmediatamente después de su eclosión. La separación se realizó bajo lupa sobre una platina porosa que filtra CO₂ que en *Drosophila* tiene efecto anestésico. Las moscas vírgenes, tanto hembras como machos, poseen una mancha en el abdomen (figura 9B) característica solo de las moscas que acaban de eclosionar.

Para el apareamiento de las hembras, se colocaron por vial 10 hembras de 0-5 días con 5 machos durante 24/48 hs. Después de este período los machos fueron descartados y las hembras utilizadas para los experimentos de actividad locomotora.

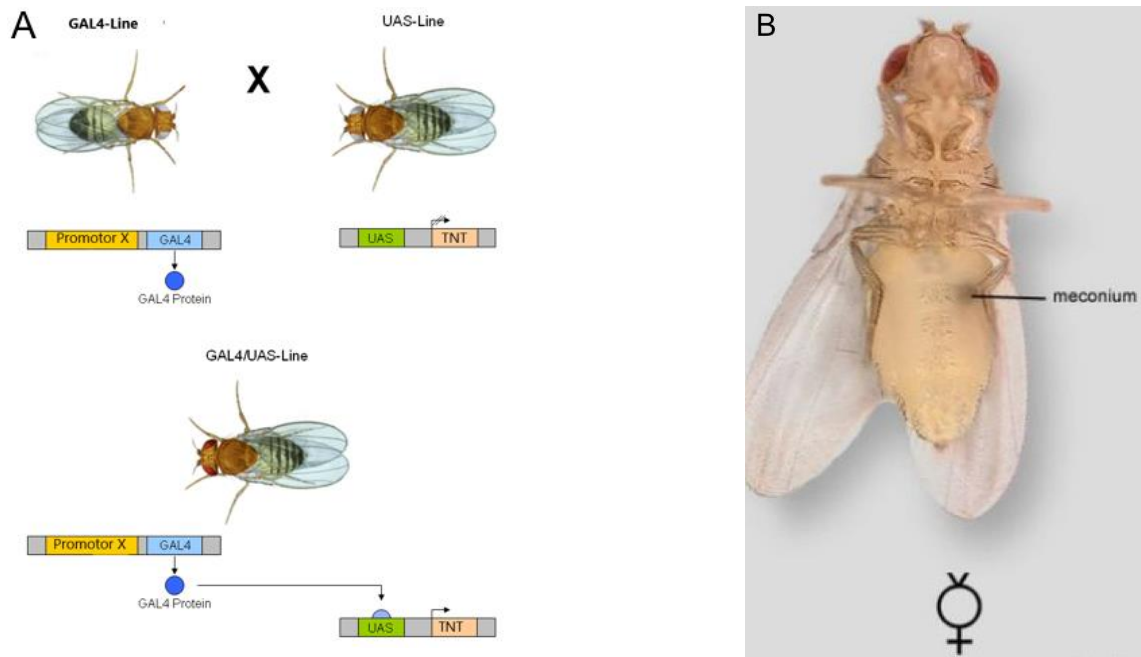


Figura 9: A) Esquema explicativo del sistema GAL4-UAS utilizado para el cruzamiento de moscas transgénicas. B) Imagen ilustrativa de una hembra recién eclosionada, presencia de una mancha negra en el abdomen (meconio).

3.3 Nomenclatura de *Drosophila*

Drosophila 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 *Drosophila* 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 en el genotipo para resumir. A continuación se presenta un ejemplo de genotipo extendido y resumido.

Cromosoma X II III IV

+/+;pdf-GAL4/pdf-GAL4 ;UAS-CD8GFP/UAS-CD8GFP;+/+ (genotipo extendido)

pdf-GAL4;UAS-CD8GFP (genotipo resumido)

A su vez, cuando se quiere indicar más de un gen o transgen en un mismo cromosoma se indica separando con una coma. En el ejemplo presentado a continuación los transgenes pdf-GAL4 y UAS- CD8GFP se encuentran en el mismo cromosoma (II del mismo parental) mientras que el transgen UAS-MMP1 se encuentra en el par homólogo (II pero del otro parental).

pdf-GAL4,UAS-CD8GFP/UAS-MMP1

Por último, los genes se escriben en minúscula e itálica (*gen*) mientras que las proteínas se indican en mayúscula y letra regular (PROTEÍNA).

3.4 Líneas Utilizadas:

Línea	Fuente	Identificador
<i>D. melanogaster</i> : w1118	VDRC	CG2759
<i>D. melanogaster</i> : w[*]; P{w[+mC]=ppk- GAL4.G}3	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 32079
<i>D. melanogaster</i> : w[*];P{w[+mC]=ppk- GAL4.G}2	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 32078
<i>D. melanogaster</i> W[*];P{w[+mC]=UAS- TeTxLC.tnt}G2	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC:28838
<i>D. melanogaster</i> UAS-NachBac-GFP	Donación de Fernanda Ceriani	
<i>D. melanogaster</i> : w[*]; P{w[+mC]=UAS- shi[ts1].K}3	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 44222

<i>D. melanogaster</i> : w[*]; P{y[+7.7] w[+mC]=UAS- TrpA1(B).K }attP16	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC: 26263
<i>D. melanogaster</i> y[1]sc[*]v[1]sev[21]; P{y[+7.7] v[+t1.8]= TRiP. HMS02175 }attP40	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC:40927
<i>D. melanogaster</i> W ¹¹¹⁸ ; P{GD3579}v13480	Vienna Stock Center	GD13480
<i>D. melanogaster</i> y[1]v[1];P{y[+7.7]v[+t1.8]=TRiP.JF03358 }attP2	Bloomington Drosophila Stock Center	BDSC:29422
<i>D. melanogaster</i> w ¹¹¹⁸ ; P{GD972}v3666	Vienna Stock Center	GD 3666

Tabla 1: Líneas transgénicas utilizadas.

3.5 Termo-genética:

Además de la inducción tejido específica, en ocasiones es necesario regular temporalmente la expresión de un gen, por lo que en los últimos años ha habido un creciente interés por lograr manipular la actividad neuronal de manera precisa y dentro de una ventana temporal acotada, lo que ha llevado al desarrollo de distintas herramientas, como es el caso de la termo-genética.

Los genes termo-sensibles permiten modificar la actividad eléctrica del grupo de neuronas de interés a través del direccionamiento espacial dado por el sistema GAL4-UAS y del condicionamiento temporal mediado por el aumento o disminución de la temperatura (Bernstein, et al.,2012)

Las dos líneas utilizadas en este proyecto son las herramientas termosensibles más empleadas en *Drosophila*. Por un lado tenemos el gen termo-sensible shibiest, el cual está involucrado en la endocitosis y es fundamental para la reincorporación de vesículas sinápticas en las terminales axonales. Bajo la temperatura restrictiva (29°C) este muestra un reciclado de vesículas deficiente, generando una depleción de las vesículas sinápticas, que impide la liberación de neurotransmisores, lo que resulta en una rápida inhibición de la transmisión sináptica (Kosaka. T, Ikeda. K, 1983). La segunda línea utilizada en este trabajo es un canal catiónico, perteneciente a la familia TPR (Transient Receptor Potential), denominado TrpA, capaz de cambiar su conductancia drásticamente dependiendo

de la temperatura. Al aumentar la temperatura estos canales permiten el ingreso de calcio al interior de la célula, despolarizando la membrana, lo cual activa canales dependientes de voltaje, desencadenando el disparo de potenciales de acción, logrando así que la neurona pase de un estado inactivo a altamente activado (Minke 2010; Ermakova, Y. G et al. 2016).

3.6 Registro de la actividad locomotora por sistema de video:

Para el registro de la actividad locomotoras, hembras vírgenes o apareadas entre 3 y 7 días post-eclosión fueron colocadas individualmente en una pista transparente de 80 mm (longitud)X 8 mm (ancho) x 8 mm (altura) , que contiene en un extremo 1 ml aproximadamente 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 es cerrado con un tapón de algodón. Las pistas están formadas por dos placas de acrílico transparente que hacen de base y techo y cada recámara está separada por una pared de acrílico blanco para evitar el contacto visual entre los individuos (figura 10A). Estas pistas son colocadas dentro de una incubadora que se encuentra a 25°C, y son iluminadas desde abajo por luces blancas (200 lux, leds blancos) e infrarrojas (850nm) que están fuera del rango visible de las moscas y permite grabar la actividad de las moscas durante las horas de oscuridad. Cada pista es captada por dos cámaras web que se encuentran a una distancia de aproximadamente 18cm y que permiten registrar la actividad de la mosca, tanto durante el día como durante la noche, ya que son sensibles al infrarrojo (850 nm) (figura 10B). La grabación de la actividad se realiza por 4 o 5 días en condiciones de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad (LO) a 25 °C. Para los experimentos en los que se utiliza termo-genética se registra la actividad de las moscas durante dos días en LO a 22°C y luego un tercer día donde se eleva la temperatura a 30°C en LO.

La información del video es enviada a una computadora, donde es analizada por un programa generado por nuestro laboratorio (escrito en python3 y usando una librería *openCV*, usado en Riva et al.,2022), que permite registrar la posición de la mosca en tiempo real. Con esta información el software de seguimiento genera un archivo de texto que contiene la posición de la mosca por segundo. 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. Estos archivos de texto son

analizados con otro software, también desarrollado en nuestro laboratorio que nos permite generar diferentes cuantificaciones de la actividad (distancia recorrida, anticipación de la mañana, anticipación de la tarde, etc) o estadísticas para el sueño (cantidad de sueño durante el día, la noche, número de episodios de sueño, cantidad de episodios).

- **Cuantificación del sueño:** en *Drosophila melanogaster* el sueño se define como aquellos intervalos de tiempo de más de 5 minutos en los que la mosca ha permanecido inmóvil, o se ha movido menos que cierto valor umbral (2mm por segundo o un cuerpo de mosca (*body length*)). Se cuantifica el tiempo total que la mosca ha permanecido en ese estado en intervalos (bines) de media hora. (Pfeiffenberger et al., 2010)
- **Cuantificación de la Actividad:** Se cuantifica como la distancia recorrida por cada mosca, cada bin de media hora. Luego se normaliza, para evitar que las moscas con mucha actividad dominen el actograma promedio

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

- **Índice de Anticipación de la mañana (MAI):** está dada por la relación entre la actividad observada en ZT: 21-24 y la actividad total entre ZT: 18-24. Dada la variabilidad de este parámetro a lo largo de los días para la misma mosca, se realizó el MAI promedio de los tres primeros días para cada mosca (Shafer & Taghert, 2009). Valores ≥ 0.5 indican que las hembras anticipan; valores < 0.5 indican que las hembras no anticipan

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

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

$k = 1, 2, 3$ (genotipos o tratamientos)

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

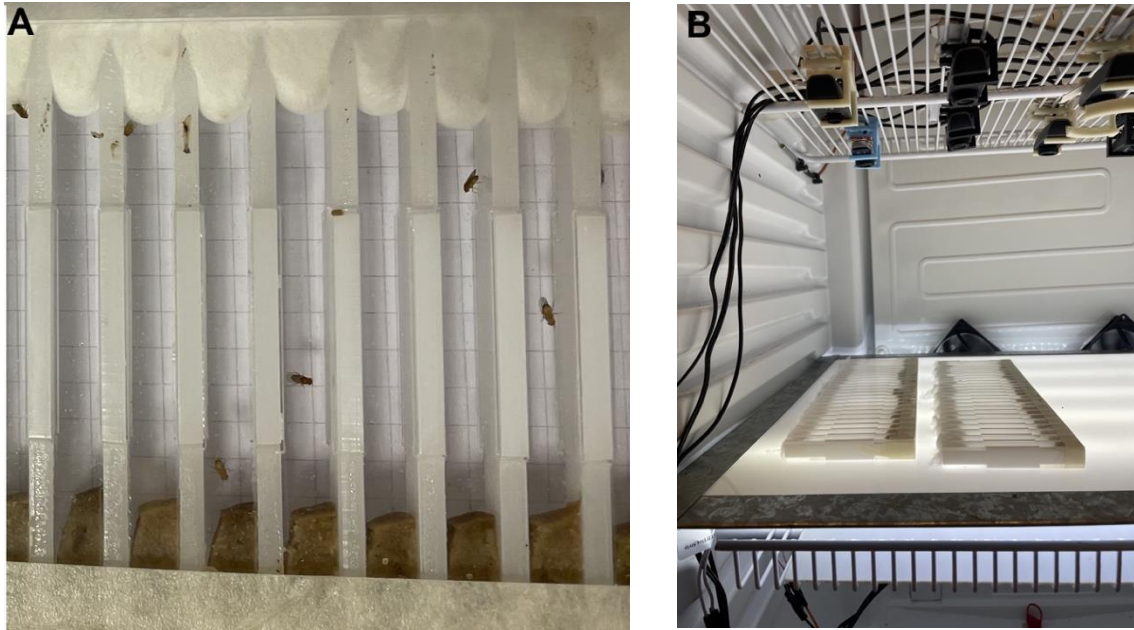


Figura 10: A) Foto del sistema de pistas utilizado, cada pista contiene una mosca que es monitoreada individualmente. B) Foto ilustrativa del montaje experimental dentro de la incubadora para la grabación por sistema de video.

3.7 Análisis Estadístico:

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prims 8. Se comprobó la distribución normal de los datos utilizando el test D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov.

Para el análisis de los datos se utilizaron los siguientes test estadísticos: ANOVA de una vía y ANOVA de dos vías seguido de un Tukey's post-hoc test, para hacer múltiples comparaciones en los datos paramétricos. Para los datos no paramétricos se realizó un test de Kruskal-Wallis seguido de un Dunn's post-hoc test. En todos los experimentos el número de individuos se refiere con la letra "n" y el número de experimentos individuales con la letra "N". El código de referencia para la significancia en las figuras se detalla a continuación: * p-value < 0.1, ** p-value < 0.05, *** p-value < 0.001, ns- value > 0.1

4 RESULTADOS

4.1 Inhibición crónica de las neuronas *ppk+* en hembras apareadas.

Múltiples trabajos han mostrado que el SP induce respuestas de post-cópula al menos a través de dos vías diferentes. Por un lado, Yang *et al.* y Häsemeyer *et al.* mostraron que inhibir la actividad neuronal de las neuronas *ppk+* y *fru+* reduce la receptividad y aumenta la puesta de huevos en hembras vírgenes, es decir causa que se comporten como apareadas (Yang *et al.*, 2009 Häsemeyer *et al.*, 2009). De igual manera Rezaval *et al.*, muestra en su trabajo que un subgrupo de neuronas *dsx+* octopaminérgicas que se encuentran en el ganglio abdominal, son estimuladoras de las respuestas de post-apareamiento, ya que inhibir su actividad en hembras vírgenes no lleva a un aumento de la puesta de huevos ni a una disminución de la receptividad (Rezaval *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta estos resultados queda asentado que el SP puede generar respuestas de post-apareamiento a través de dos mecanismos opuestos, por un lado estimulando la actividad de las neuronas *dsx+* que lleva a una reducción de la receptividad y un aumento de la puesta de huevos y por otro inhibiendo la actividad de las neuronas *ppk+/fru+* del tracto genital (Hausmann *et al.*, 2013).

Resultados del laboratorio muestran que la anticipación de la mañana se pierde en hembras apareadas y que estos niveles se recuperan cuando se expresa un RNA de interferencia para el SPR en las neuronas *ppk+*. (Riva *et al.*, 2022). Con el objetivo de identificar mediante qué mecanismo, (inhibición o activación), las neuronas *ppk+* modifican los niveles de anticipación de la mañana, decidimos testear si el SP inhibe la actividad sináptica de las neuronas *ppk+*, generando la pérdida de la anticipación. Para probar esto, silenciamos las neuronas *ppk+* a través de la expresión constitutiva de la toxina tetánica (TNT) que bloquea la transmisión sináptica, evitando la liberación de vesículas sinápticas (Sweeney *et al.*, 1995), en hembras vírgenes y en hembras apareadas y analizamos la actividad locomotora en ciclos de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad durante 3 días.

El silenciamiento de las neuronas *ppk+* en hembras vírgenes no generó alteraciones en el patrón locomotor ni en la anticipación de la mañana con respecto a las hembras controles (Figura 11A, 11B). Más aún, las hembras vírgenes *ppkGal4>TNT* presentaron altos niveles de anticipación (cercaos al valor de 0.8) al igual que ambos controles.

Por otro lado, la expresión de TNT en las neuronas *ppk+* en hembras apareadas produjo un aumento gradual de la actividad antes del encendido de las luces y por lo tanto generó un aumento significativo de los niveles de anticipación de la mañana en comparación con ambos controles. (Figura 11C,11D).

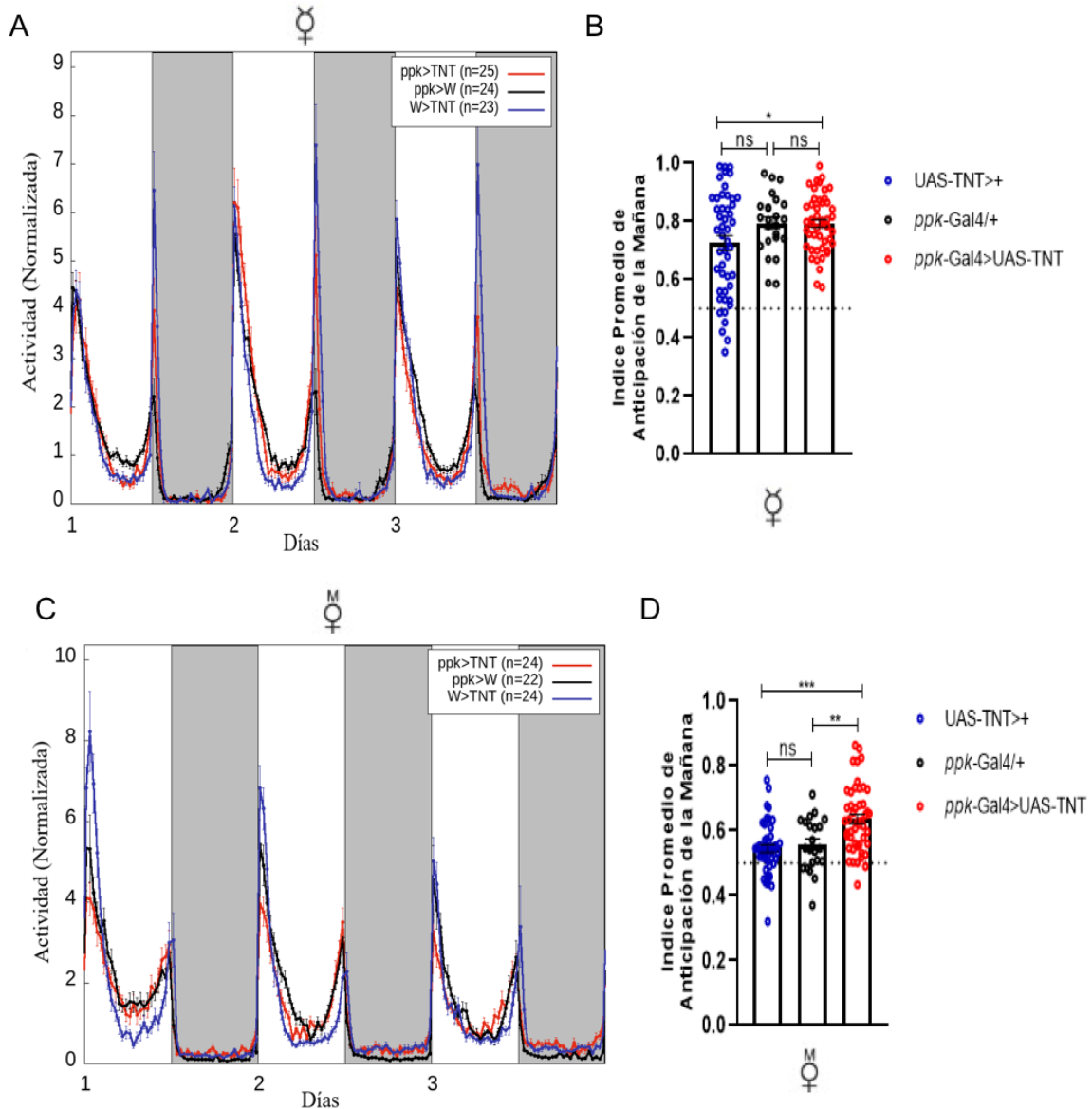


Figura 11: El silenciamiento crónico de las neuronas *ppk+* revierte la pérdida de anticipación de la mañana en hembras apareadas.

- a) Actograma representativo de Hembras vírgenes: Actividad locomotora normalizada. En azul la actividad del control *UAS-TNT>+* (n=23), en negro el control *ppk-Gal4>+* (n=24) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk-Gal4>UAS-TNT* (n=25). Los períodos de luz y oscuridad están representados con las barras blancas y grises respectivamente.
- b) Índice promedio de Anticipación de la mañana de los tres primeros días en hembras vírgenes. En azul el control *UAS-TNT>+* (n=47), en negro el control *ppk-Gal4>+* (n=24) y en rojo el genotipo tratamiento

ppk-Gal4>UAS-TNT (n=47). Las barras corresponden al SEM. Se realizó un Anova de una vía (F=3.486, p-valor=0.0339), seguido de un tukey test de múltiples comparaciones.

- c) Actograma representativo de Hembras Apareadas: Actividad locomotora normalizada. En azul la actividad del control *UAS-TNT>+* (n=24), en negro el control *ppk-Gal4>+* (n=22) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk-Gal4>UAS-TNT* (n=24). Los períodos de luz y oscuridad están representados con las barras blancas y grises respectivamente.
- d) Índice promedio de Anticipación de la mañana de los tres primeros días Hembras Apareadas. En azul el control *UAS-TNT>+* (n=45), en negro el control *ppk-Gal4>+* (n=22) y en rojo el tratamiento *ppk-Gal4>UAS-TNT* (n=48). Las barras corresponden al SEM. Se realizó un Anova de una vía (F=12.99, p-valor=0.0001) seguido de un Tukey test de múltiples comparaciones.

N=2

Las hembras, luego de la cópula con el macho, aumentan su actividad y consecuentemente pierden su sueño diurno, que se considera como otra respuesta de post-cópula (Isaac et al 2010). Teniendo en cuenta esto evaluamos si el silenciamiento crónico de las neuronas *ppk+* en hembras apareadas o vírgenes afectaba la pérdida del sueño diurno. La figura 12 muestra que los patrones de sueño y el porcentaje de sueño diurno en hembras vírgenes y apareadas *ppkGal4>TNT* no varían significativamente con respecto a sus controles.

En conjunto estos resultados sugieren que el apareamiento activa a las neuronas *ppk+* ya que su silenciamiento crónico recupera la anticipación en hembras apareadas. Estos resultados muestran también, que la actividad de las neuronas *ppk+* es dispensable para el control de la pérdida de sueño diurno ya que su silenciamiento no revierte esta pérdida. Mostrando una participación diferencial de estas neuronas en el control de distintos comportamientos de post-cópula.

4.2 Inhibición aguda de las neuronas *ppk+* en hembras apareadas.

Dados los resultados obtenidos en el experimento anterior, donde la inhibición crónica de las neuronas *ppk+* llevó a una recuperación de la actividad anticipatoria de la mañana, decidimos evaluar los efectos de la inhibición aguda sobre el patrón de actividad locomotor y de sueño en hembras apareadas. Esto trae como ventaja la restricción temporal de la inhibición, lo que permite evaluar el efecto exclusivo del silenciamiento neuronal evitando efectos compensatorios o deletéreos que se puedan desencadenar por la pérdida durante todo el desarrollo de la funcionalidad del grupo neuronal de interés.

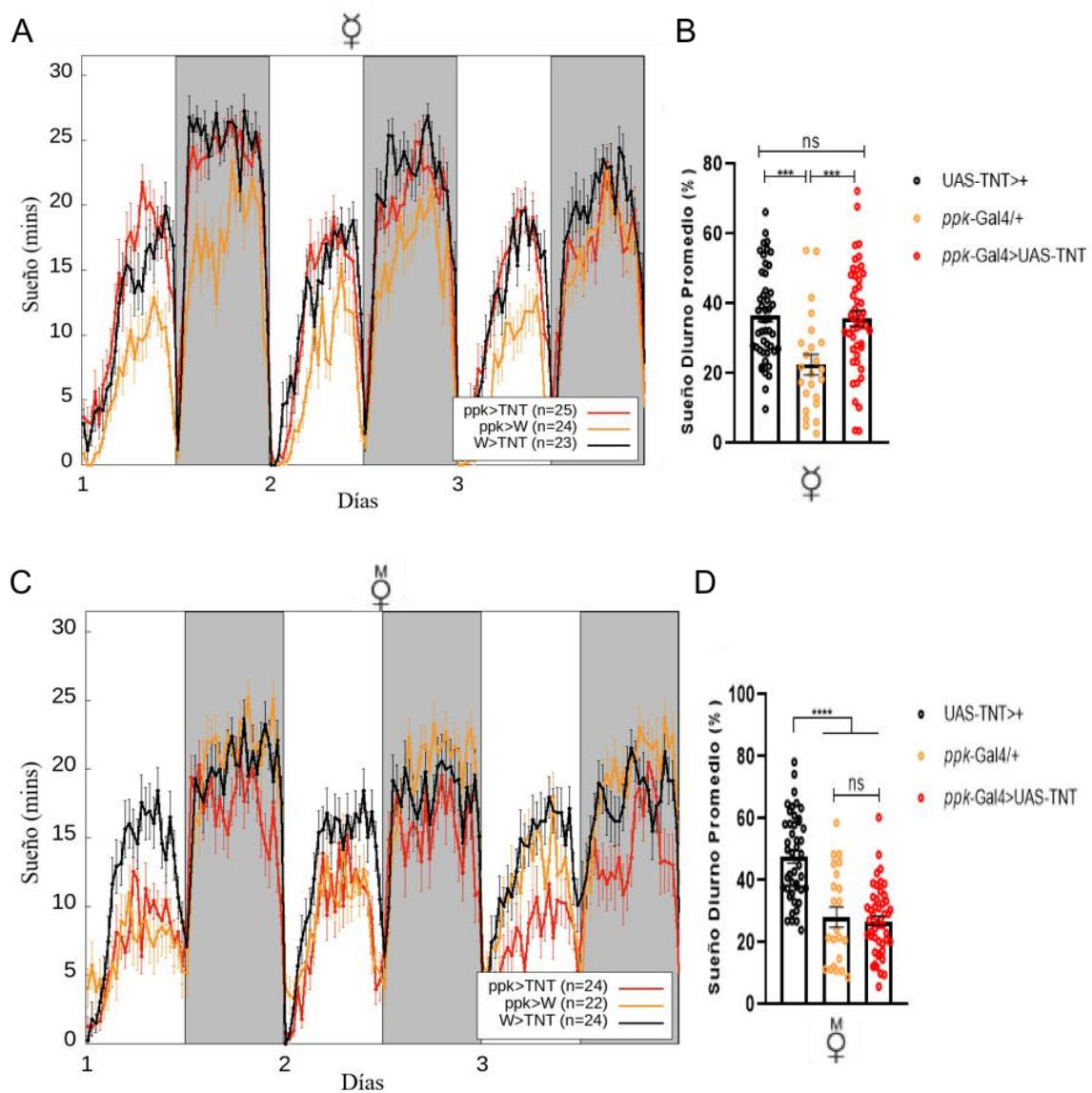


Figura 12: El silenciamiento crónico de las neuronas *ppk+* no modifica la pérdida de sueño diurno en hembras apareadas

- Sueñograma representativo de hembras vírgenes: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora. En negro el control UAS-TNT>+ (n=23) en amarillo el control *ppk*-Gal4>> (n=24) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk*-Gal4>UAS-TNT (n=25). Los períodos de luz y oscuridad están representados con las barras blancas y grises respectivamente.
- Sueño Diurno total ZT0-12, para los primeros 3 días expresado en porcentaje en hembras vírgenes. En negro el control UAS-TNT>+ (n=47), en amarillo el control *ppk*-Gal4>> (n=24) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk*-Gal4>UAS-TNT (n=47). Las barras representan el SEM. Se realizó un Anova de una vía (F=9.055, p-valor=0.0002).
- Sueñograma representativo de hembras apareadas: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora. En negro el control UAS-TNT>+ (n=23), en amarillo el control *ppk*-Gal4>>

(n=24) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk-Gal4>UAS-TNT* (n=25). Los períodos de luz y oscuridad están representados con las barras blancas y grises respectivamente.

- d) Sueño Diurno total (ZT0-12) de los tres primeros días, expresado en porcentaje hembras apareadas. En negro el control *UAS-TNT>+* (n=45) en amarillo el control *ppk-Gal4>+* (n=22) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk-Gal4>UAS-TNT* (n=48). Las barras corresponden al SEM. Se realizó un Anova de una vía (F=33.06, p-valor=0.0001) seguido de un Tukey test de múltiples comparaciones.

N=2

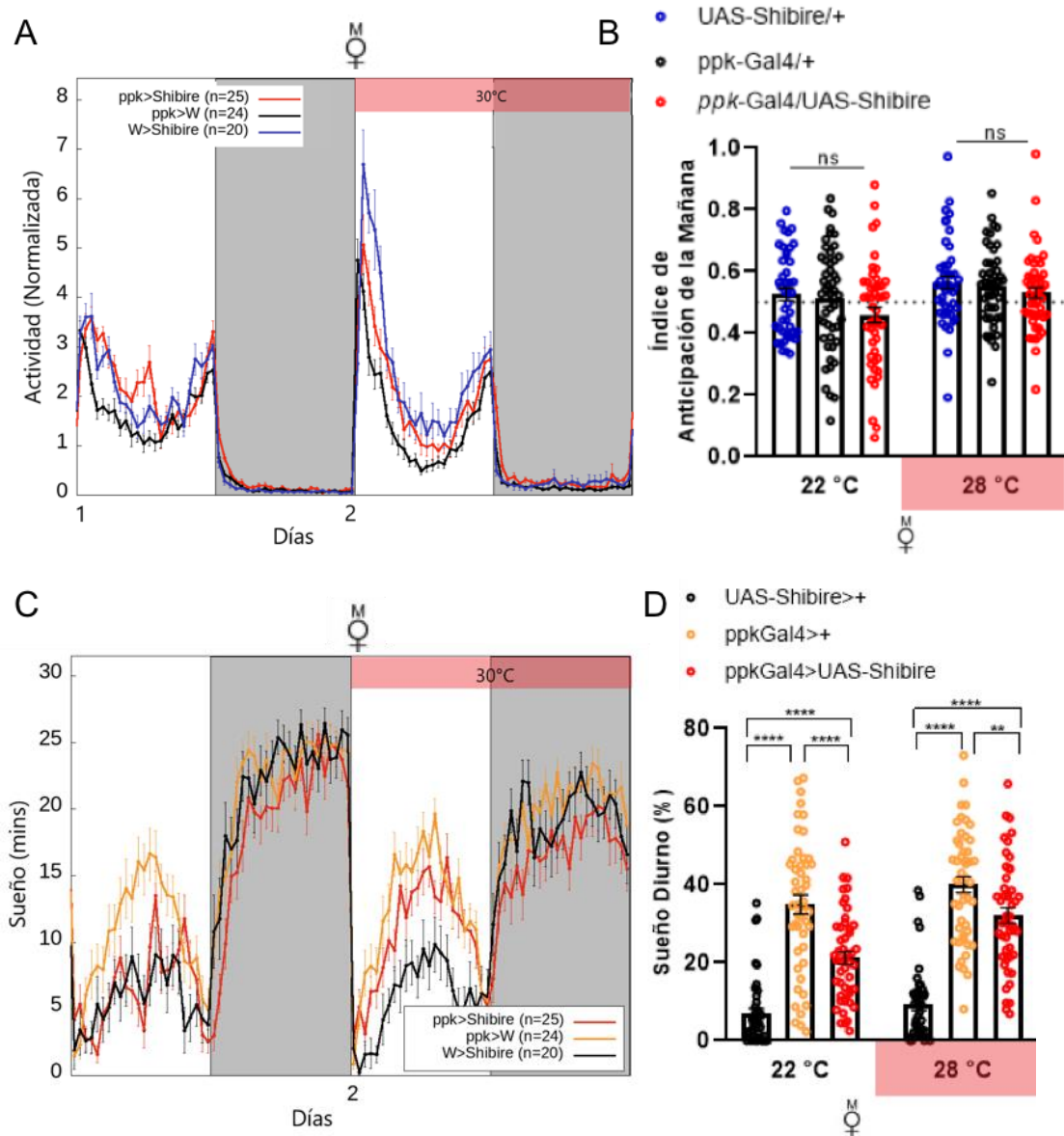


Figura 13: Inhibición aguda de la actividad de las neuronas *ppk+* en hembras apareadas

- a) Actograma representativo: actividad locomotora normalizada. En azul la actividad del control *UAS-Shibire>+* (n=20) en negro el control *ppk-Gal4>+* (n=24) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk-*

Gal4>UAS-Shibire (n=25). Los períodos de luz y oscuridad están representados con las barras blancas y grises respectivamente. La barra roja indica las horas de restricción temperatura ZT0-24.

- b)** Índice de anticipación de la mañana para el día control (22°C) y el día de estimulación (28°C). En azul la actividad del control UAS-Shibire>+ (n=44) en negro el control *ppk*-Gal4>+ (n=49) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk*-Gal4>UAS-Shibire (n=48). La barra roja indica el día de estimulación por aumento de la temperatura. Se realizó un test de Anova de dos vías y un post-test Sidak de comparaciones múltiples.
- c)** Sueñograma representativo: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora para el día control (22°C) y el día de estimulación (28°C). En negro el control UAS-Shibire>+ (n=20), en amarillo el control *ppk*-Gal4>+ (n=24) y en rojo el tratamiento *ppk*-Gal4>UAS-Shibire (n=25). Los períodos de luz y oscuridad están representados con las barras blancas y grises respectivamente. La barra roja indica el día de restricción por temperatura ZT0-24.
- d)** Sueño diurno: Sueño total ZT (0-12) expresado en porcentaje, para el día control (22°C) y el día de estimulación (28°C). En negro el control UAS-Shibire>+ (n=44) en amarillo el control *ppk*-Gal4>+ (n=49) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk*-Gal4>UAS-Shibire (n=48). La barra roja indica el día de estimulación por aumento de la temperatura. Se realizó un Anova de dos vías seguido de un post-test Tukey de comparaciones múltiples.

N=2

Para esto expresamos el mutante dominante negativo termosensible de dinamina (*shibire^{ts}*) que inhibe la transmisión sináptica (Kosaka, T, Ikeda, K, 1982; Kitamoto, T. 2001).

Bajo la temperatura control de 22°C, las hembras tratadas se comportaron de modo indistinguible de los controles, tanto en el patrón locomotor como en la anticipación de la mañana (figura 13A, 13B): ninguna presentó un aumento gradual de la actividad antes del encendido de las luces, como era de esperarse en hembras apareadas. Al elevarse la temperatura a 28°C (temperatura de restricción), se observa un aumento de la actividad anticipatoria de la mañana tanto para las hembras *ppk*-GAL4>UAS-*Shibire^{ts}* como para los respectivos controles, no mostrando diferencias significativas entre si para este parámetro.

En cuanto al sueño, bajo la temperatura control (22°C), no se observan diferencias entre la línea tratamiento (*ppk*-Gal4>UAS-*Shibire^{ts}*) y los controles tanto en el sueñograma como en la cantidad de sueño diurno. De igual manera bajo la temperatura de restricción, no se observan diferencias en estos parámetros.

En conjunto estos resultados indicarían que la inhibición aguda al menos por 24 horas no genera un aumento de la anticipación de la mañana, ni cambios en el patrón y cantidad de sueño diurno.

4.3 Activación crónica de las neuronas *ppk+* en hembras vírgenes

Si el silenciamiento crónico de las neuronas *ppk+* en hembras apareadas conduce a una recuperación de los niveles de anticipación de la mañana, pensamos que la activación de las mismas en hembras vírgenes conduciría a una pérdida de este comportamiento. Para activar crónicamente las neuronas *ppk+* expresamos *NachBac*, un canal que aumenta la excitabilidad de la membrana que lo expresa (Ren et al., 2001), para analizar las consecuencias de la despolarización en los patrones de actividad de hembras vírgenes.

La activación de las neuronas *ppk+* durante todo el desarrollo (*ppk-Gal4>UAS-NachBac*) generó alteraciones en el patrón de actividad locomotor como la pérdida del pico de actividad de la tarde en las hembras tratadas. La línea control *UAS-NachBac>+* también mostró alteraciones en el patrón de actividad que no se observaron en el control *ppk-Gal4>+* (Figura 14 A/B). En cuanto a la anticipación de la mañana no se encontraron diferencias significativas entre las moscas tratadas y los controles.

Así mismo, no se encontraron diferencias en el patrón de sueño y el porcentaje de sueño diurno entre hembras tratadas y controles (Figura 14 C/D).

En conjunto estos resultados muestran que la activación de las neuronas *ppk+* en hembras vírgenes no llevó a la pérdida de la anticipación de la mañana tal como se esperaba. A su vez sugieren que la activación de las neuronas *ppk+* no influye en los patrones de sueño diurno.

4.4 Activación aguda de las neuronas *ppk+* en hembras vírgenes.

Debido a que la activación constitutiva no permitió sacar conclusiones sobre el efecto de la activación de las neuronas *ppk+* en hembras vírgenes, decidimos realizar la activación aguda de estas neuronas, mediante la expresión del transgen *UAS* que expresa el canal de Ca^{2+} termosensible *TrpA* y analizar las consecuencias de la despolarización transiente en el patrón de actividad de hembras vírgenes en ciclos de luz y oscuridad. Esta estrategia permite restringir temporalmente la activación neuronal, que como mencionamos anteriormente tiene como ventaja que disminuye los efectos compensatorios, o no deseados que podría llegar a tener la activación neuronal durante todo el desarrollo.

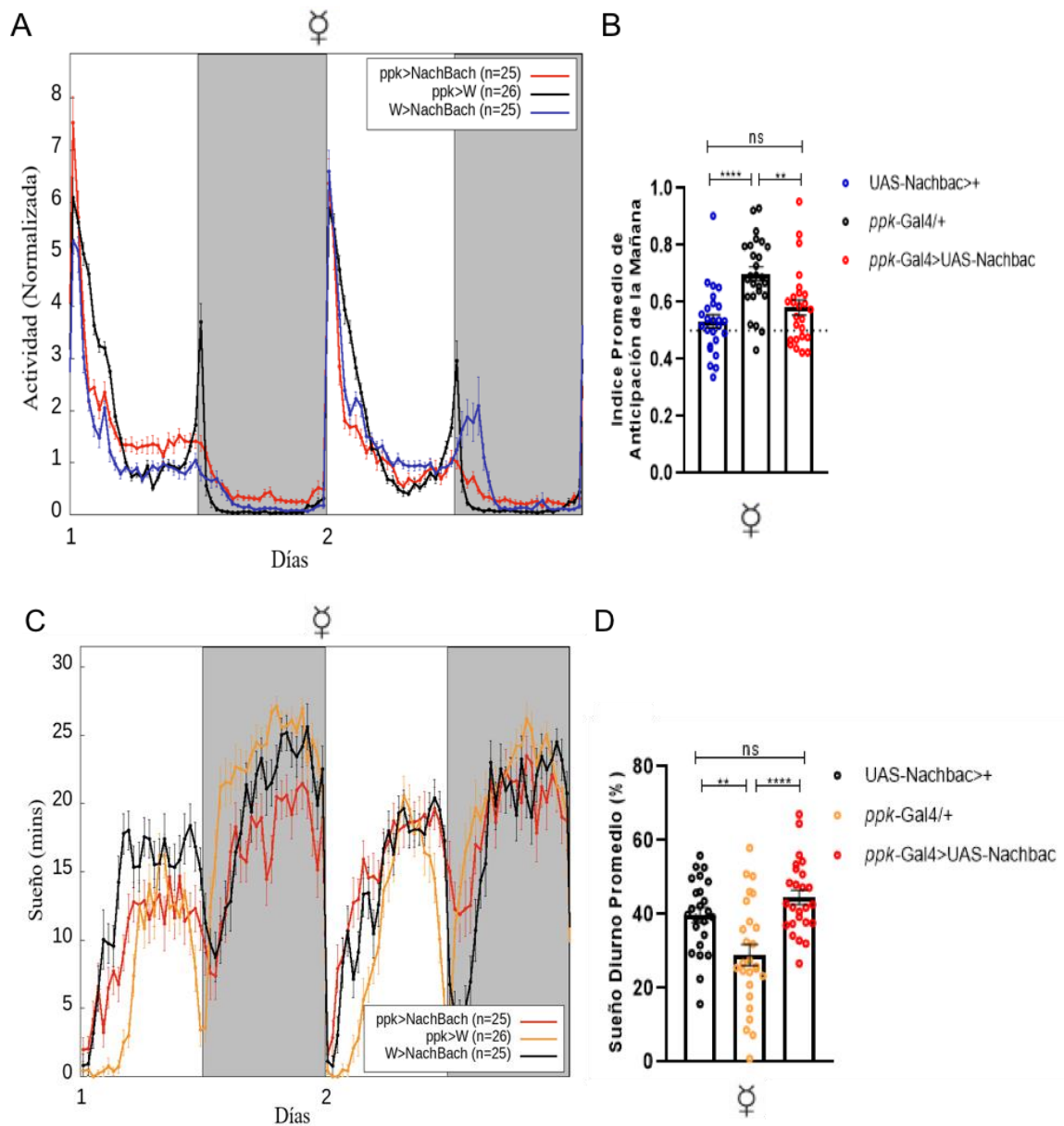


Figura 14: Activación crónica de las neuronas *ppk+* en hembras vírgenes.

- a) Actograma: Actividad locomotora normalizada. En azul la actividad del control *UAS-NachBac>+* (n=25) en negro el control *ppk-Gal4>+* (n=26) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk-Gal4>UAS-NachBac* (n=23). Los períodos de luz y oscuridad están representados con las barras blancas y grises respectivamente. La flecha azul indica la pérdida del pico de actividad de la tarde.
- b) Índice promedio de Anticipación de la mañana de los tres primeros días. En gris oscuro el control *UAS-NachBac>+* (n=25), en gris claro el control *ppk-Gal4>+* (n=26) y en rojo el tratamiento *ppk-Gal4>UAS-NachBac* (n=25). Las barras corresponden al SEM. Se realizó un test de Anova de una vía ($F=11.87$, p -valor=0.0001) y un post-test Tukey de comparaciones múltiples.
- c) Sueñoograma: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora. En negro el control *UAS-NachBac>+* (n=25), en amarillo el control *ppk-Gal4>+* (n=26) y en rojo el tratamiento *ppk-Gal4>UAS-NachBac*.

- d) Sueño total diurno (ZT0-12) de los primero tres días expresado en porcentaje de cada genotipo indicado. Las corresponden al SEM. Se realizo un test de Anova de una vía ($F=11.82$, $p=0.0001$) y un post-test Tukey de comparaciones múltiples.

N=1

En la temperatura control de 22°C las hembras vírgenes *ppk-Gal4>UAS-TrpA* se comportaron indistinguiblemente de los controles y todas anticiparon (Figura 15A, 15B). En la temperatura de activación de 30 °C la estimulación aguda de las neuronas *ppk+*, en un período de 24 horas (ZT 0-24), produjo un aumento de la actividad durante el día y la noche y tal como se esperaba, una disminución significativa del índice de anticipación de la mañana que no se observó en los controles (Figura 15A, 15B). A pesar de que no se muestran diferencias significativas con el control de genotipo *ppk-Gal4>+* se observa una tendencia a la disminución (p -valor=0.0748).

El análisis del patrón de sueño mostró que a 22 °C las hembras *ppkGal4>UAS-TrpA* desplegaron el mismo patrón de sueño que los genotipos controles (Figura 16A) y no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de sueño diurno y nocturno (Figura 16B, 16C). Sin embargo, el aumento de temperatura desencadenó una despolarización aguda de las neuronas *ppk+* lo que provocó una disminución tanto del sueño diurno como nocturno (Figura 16B, 16C).

En conjuntos estos resultados muestran que la activación de las neuronas *ppk+* de manera aguda en hembras vírgenes produce profundos cambios en el patrón de actividad locomotora y el sueño y una disminución del índice de anticipación de la mañana como el que se observa en las hembras luego del apareamiento.

4.5 Neurotransmisores liberados por las neuronas *ppk+*.

Con el objetivo de identificar mediante la liberación de qué neurotransmisor las neuronas *ppk+* se comunican con su blanco post-sináptico para regular el índice de anticipación de la mañana expresamos de manera constitutiva en las neuronas *ppk+* de hembras apareadas interferencias de RNA (Tijsterman & Plasterk, 2004), para transportadores vesiculares de distintos neurotransmisores y analizamos los patrones de actividad locomotora en ciclos de luz y oscuridad durante 4 días. Cuantificamos el efecto en los dos comportamientos de post-apareamiento de interés; el índice de anticipación de la mañana y el sueño diurno.

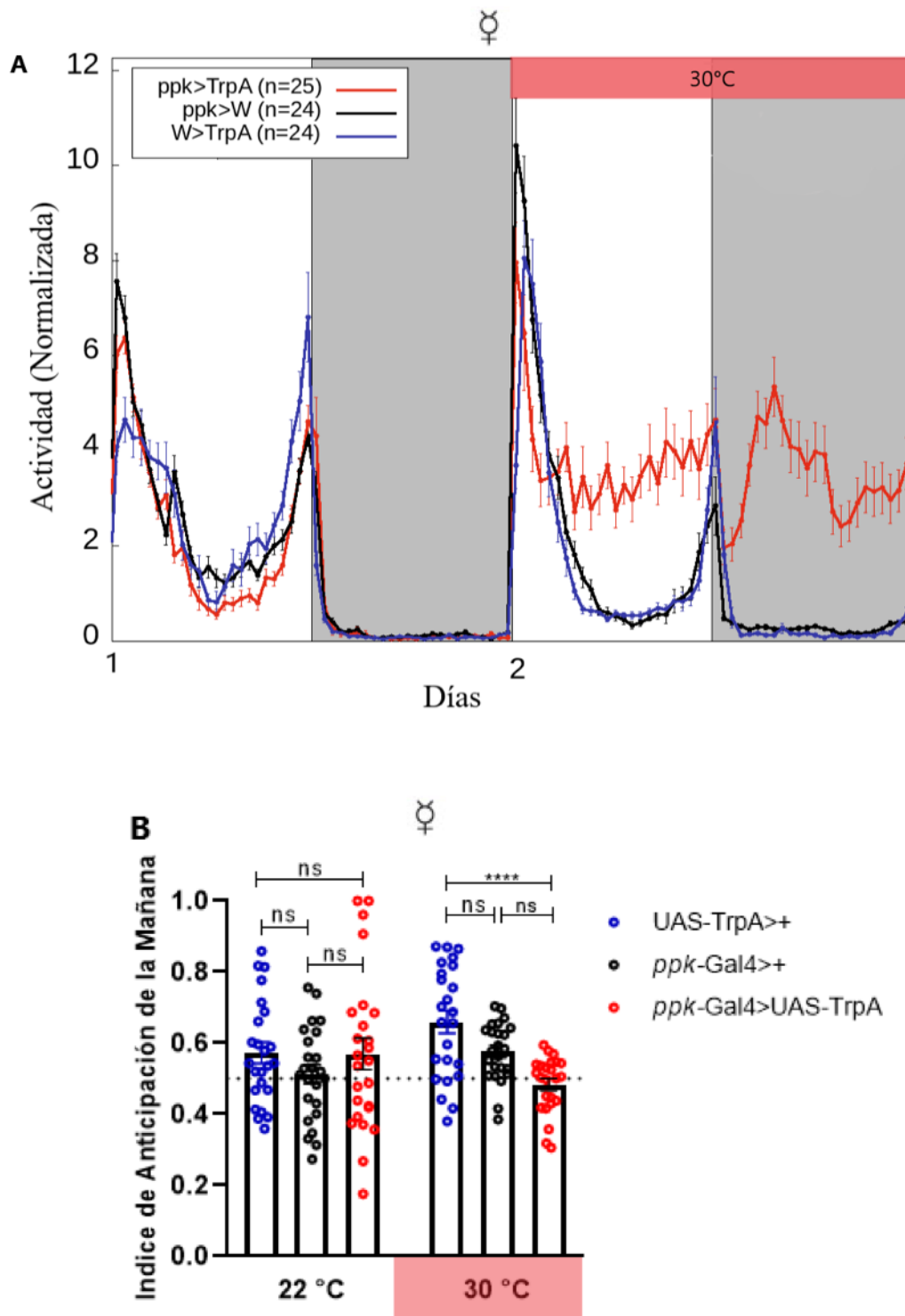


Figura 15: La activación aguda de las neuronas *ppk*+ en hembras vírgenes aumenta la actividad e induce la pérdida de la anticipación de la mañana.

- a) Actograma: actividad locomotora normalizada. En azul la actividad del control UAS-TrpA>+ (n=24) en negro el control *ppk*-Gal4>+ (n=24) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk*-Gal4>UAS-TrpA (n=25). Los períodos de luz y oscuridad están representados con las barras blancas y grises respectivamente. La barra roja indica las horas de estimulación por el aumento de la temperatura ZT0-24.

b) Índice de anticipación de la mañana para el día control (22 °C) y el día de estimulación (30 °C). En azul la actividad del control UAS-TrpA>+ (n=24) en negro el control *ppk*-Gal4>+ (n=24) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk*-Gal4>UAS-TrpA (n=25). La barra roja indica el día de estimulación por aumento de la temperatura. Se realizó un test de Anova de dos vías y un post-test Sidak de comparaciones múltiples.

N=1

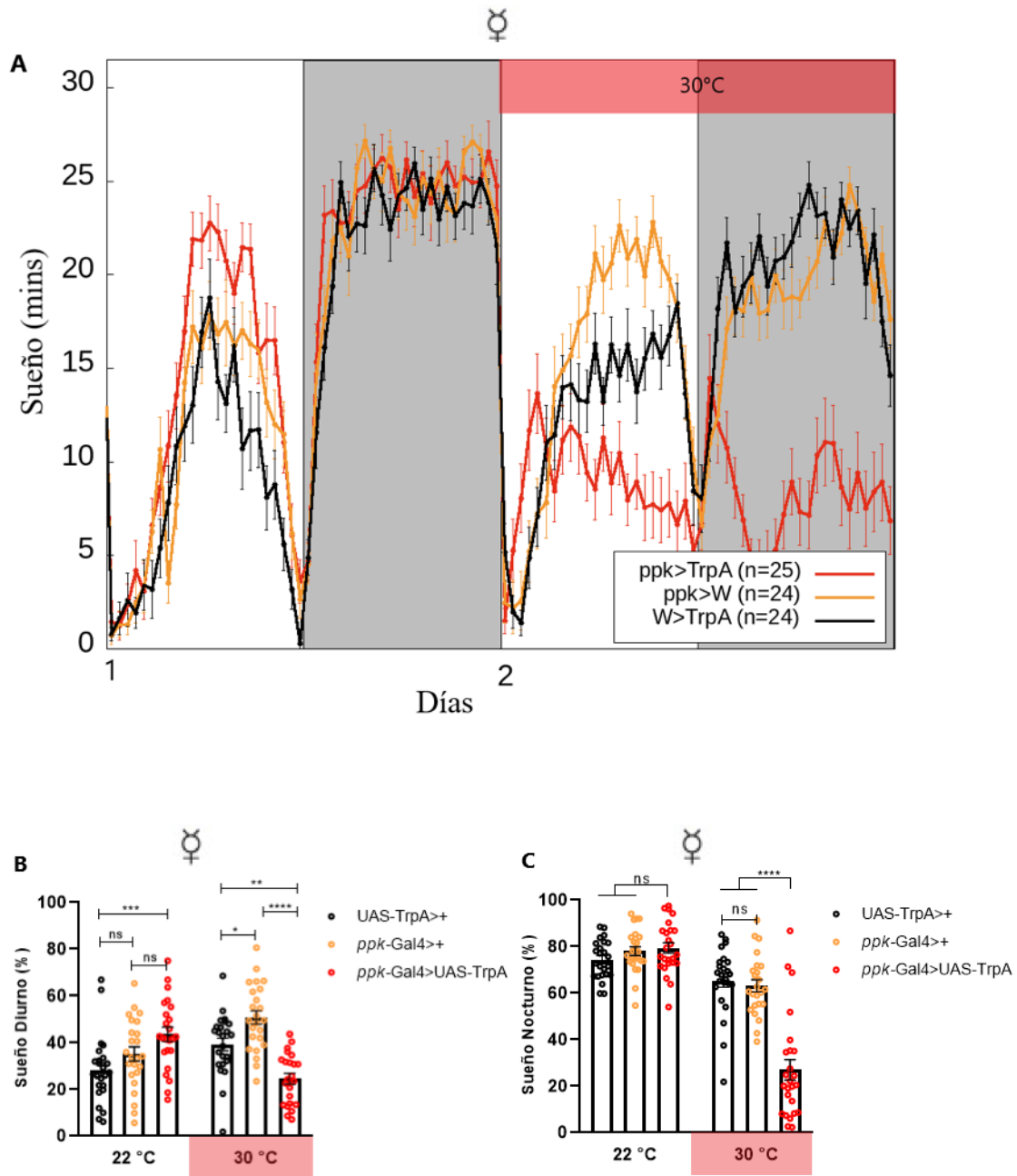


Figura 16: La activación termo-genética de las neuronas *ppk*+ en hembras vírgenes reduce el sueño

- a) Sueñograma: cantidad de sueño acumulado en minutos por cada bin de media hora. En negro el control UAS-TrpA>+ (n=24), en amarillo el control *ppk-Gal4>+* (n=24) y en rojo el tratamiento *ppk-Gal4>UAS-TrpA* (n=25).
- b) Sueño diurno: Sueño total ZT (0-12) para el día control (22°C) y el día de estimulación (30°C). En negro el control UAS-TrpA>+ (n=24) en amarillo el control *ppk-Gal4>+* (n=24) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk-Gal4>UAS-TrpA* (n=25). La barra roja indica el día de estimulación por aumento de la temperatura. Se realizó un Anova de dos vías seguido de un post- test Tukey de comparaciones múltiples.
- c) Sueño Nocturno: Sueño total ZT (12-24) para el día control (22°C) y el día de estimulación (30°C). En azul la actividad del control UAS-TrpA>+ (n=24) en amarillo el control *ppk-Gal4>+* (n=24) y en rojo el genotipo tratamiento *ppk-Gal4>UAS-TrpA* (n=25). La barra roja indica el día de estimulación por aumento de temperatura. Se realizó un Anova de dos vías seguido de un post- test Tukey de comparaciones múltiples.

N=1

La figura 17A muestra que la disminución de los distintos transportadores vesiculares de neurotransmisores en las neuronas *ppk+* no generó un cambio significativo en la recuperación de la anticipación de la mañana con respecto a los genotipos controles (*ppk-Gal4/+* y los respectivos UAS).

Por otro lado, el sueño diurno se vio afectado por la inhibición de la liberación de acetilcolina en las neuronas *ppk+*. Como podemos ver en la figura 17B las hembras apareadas del genotipo *ppk-Gal4>UAS-RNAiAcetilcolina* mostraron un aumento muy significativo del sueño diurno con respecto a los controles.

A continuación, para comprobar si el efecto observado en el sueño diurno era dependiente o independiente del estado de apareamiento de las hembras, realizamos el mismo procedimiento, pero analizamos la actividad locomotora de hembras vírgenes. Como se puede ver en la figura 18 el análisis de los patrones de sueño en hembras vírgenes mostro que la inhibición de liberación de acetilcolina por parte de las neuronas *ppk+* no genera un cambio significativo del porcentaje de sueño diurno con respecto a los controles.

Estos resultados sugieren entonces que las neuronas *ppk+* se activan por señales gatilladas por el apareamiento y liberan acetilcolina lo cual provoca el aumento de actividad observado en hembras apareadas y la pérdida de sueño diurno.

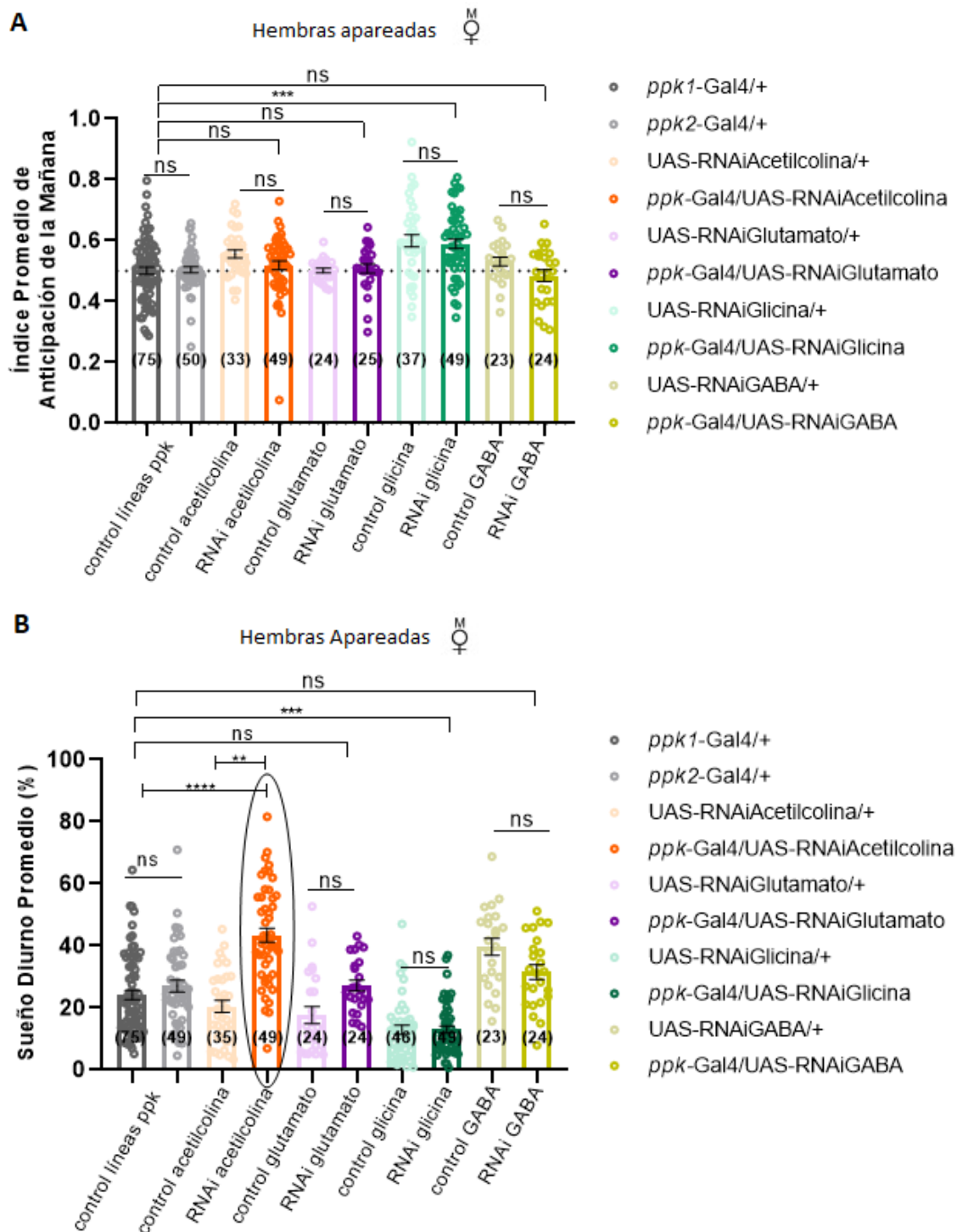


Figura 17: Screen de neurotransmisores liberados por las neuronas *ppk+* en hembras apareadas y su efecto en el índice de anticipación de la mañana y el sueño diurno.

a) Índice de anticipación de la mañana de los tres primeros días, correspondiente a cada genotipo indicado. Se realizó un Anova de una vía ($F=8.157$, $p\text{-valor}=0.0001$) y un test Tukey de comparaciones múltiples. Entre paréntesis en cada columna el número de individuos para cada genotipo.

- b) Sueño diurno total ZT0-12 expresado en porcentaje, para cada genotipo correspondiente. Se realizó un test de Kruskal-Wallis y un test Dunn de comparaciones múltiples.

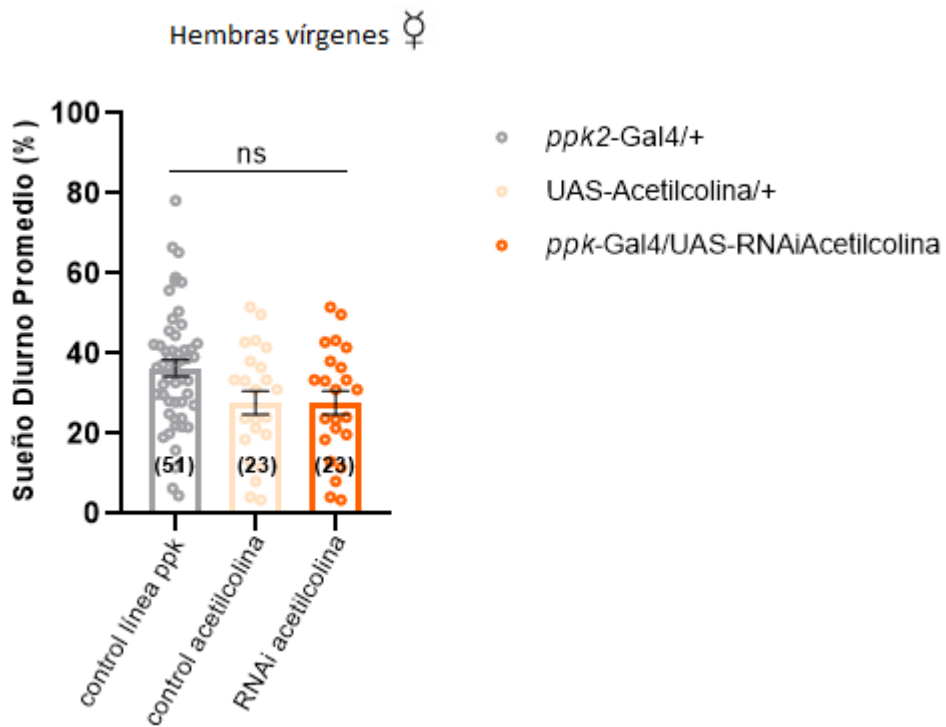


Figura 18: Inhibición de la liberación de Acetilcolina en hembras vírgenes.

- a) Porcentaje de sueño diurno total ZT0-12, de los tres primeros días de los genotipos indicados. En gris el control *ppk-Gal4>+* (n=54), en naranja claro el control UAS-RNA*Acetilcolina>+* (n=23) y en naranja oscuro el tratamiento *ppk-Gal4>UASAcetilcolina* (n=24). Entre paréntesis en cada columna el número de individuos para cada genotipo.

N=1

5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En este trabajo analizamos algunos aspectos del rol de las neuronas *ppk+* en la regulación de la anticipación de la mañana en hembras apareadas y su participación en la regulación del sueño diurno. Implementamos dos técnicas diferentes para la modulación de la actividad neuronal, una crónica a lo largo de todo el desarrollo de la mosca y la otra aguda, que permite controlar de manera reversible y temporalmente acotada la actividad neuronal. Los resultados obtenidos apoyan nuestra hipótesis de que la actividad de las neuronas *ppk+* modifica los patrones de actividad de las hembras dado que su silenciamiento en hembras apareadas recupera la anticipación de la mañana, mientras que su activación en hembras vírgenes aumenta la actividad general de las moscas eliminando el aumento progresivo que sucede antes del encendido de las luces, desapareciendo así la anticipación de la mañana (Figura 11B, C- Figura15A, B).

Luego para identificar la naturaleza neuroquímica de las neuronas *ppk+* y su relevancia en el control de la actividad en hembras, realizamos un *screen* utilizando interferencias de RNAs para disminuir la liberación de distintos neurotransmisores en estas neuronas. Nuestros resultados indican que las neuronas *ppk+* liberan acetilcolina provocando el aumento de actividad durante el día y la pérdida de sueño observado en hembras apareadas. La relevancia de cada uno de estos experimentos en contexto de los datos de la literatura, así como las perspectivas a futuro se discuten a continuación.

5.1 El silenciamiento crónico de las neuronas *ppk+* en hembras apareadas recupera la anticipación de la mañana.

La mayoría de los trabajos realizados sobre efectos de post-apareamiento están enfocados en los comportamientos de oviposición y receptividad al macho. Neuronas *ppk+* pertenecientes al grupo SPSN que se expresan en el sistema reproductivo de las hembras han sido descritas y caracterizadas como uno de los grupos responsables de regular esas respuestas de post-cópula (Lee et al., 2016.). Experimentos fisiológicos demuestran que el SP regula negativamente la excitabilidad de las neuronas SPSN y reduce la actividad del circuito SPSN-SAG (Feng et al,2014). Así mismo, antecedentes previos mostraban que bloquear la transmisión sináptica de las neuronas *ppk+* que se expresan en el tracto reproductivo en hembras vírgenes desencadenaba respuestas similares a las de hembras

apareadas, como el aumento de la puesta de huevos y una disminución de la receptividad (Lee et al., 2016, Yang et al., 2009).

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo muestran que la disminución de los niveles de expresión del SPR (*sex peptide receptor*) específicamente en las neuronas *ppk+* recupera la anticipación de la mañana en hembras apareadas (Riva et al., 2022). Teniendo en cuenta estas evidencias, es posible hipotetizar que, al disminuir la expresión del SPR en las neuronas *ppk+*, éstas no sean inhibidas por el SP y por lo tanto es posible recuperar la anticipación de la mañana en hembras apareadas. Para testear esta hipótesis, la estrategia que adoptamos fue silenciar constitutivamente las neuronas *ppk+*, tanto en hembras vírgenes como apareadas (Figura 11). De acuerdo a esta hipótesis el silenciamiento de estas neuronas en hembras vírgenes llevaría a una pérdida de la anticipación de la mañana y no modificaría la anticipación en las hembras apareadas. Sin embargo, para nuestra sorpresa, los resultados obtenidos en este trabajo muestran exactamente el escenario inverso, el silenciamiento de las neuronas *ppk+* en hembras apareadas produjo una recuperación de la anticipación de la mañana (Figura 11C-D), mientras que no se vio ningún efecto en la actividad anticipatoria en hembras vírgenes tras el silenciamiento (Figura 11A-B).

Esta idea se alinea con resultados reportados en otros trabajos, que sugieren múltiples vías de señalización, por las cuales el SP genera los cambios comportamentales de post-cópula, como es el caso de la puesta de huevos y la receptividad, que se ven afectados de manera diferencial por la manipulación de los distintos subgrupos neuronales que expresan *dsx*, *fru* o *ppk* (Rideout et al., 2010, Feng et al., 2014, Hausmann et al., 2013). Por ejemplo, el silenciamiento de todas las neuronas *ppk+* inhibe la puesta de huevos en hembras apareadas (Yang et al., 2009); de manera similar, el silenciamiento de las neuronas *dsx* inhibe la puesta de huevos en hembras apareadas y su activación en hembras vírgenes disminuye la receptividad, imitando el comportamiento de una hembra apareada (Rezaval et al., 2014, Rideout et al., 2010). En contraste, bloquear la transmisión sináptica de las SPSN en hembras vírgenes, simula la exposición al SP, comportándose estas como apareadas, tanto para la puesta de huevos como a receptividad (Hasemeyer et al., 2009, Yang et al., 2009). Estas evidencias refuerzan la idea de que distintos subgrupos de neuronas que son *ppk+* o *fru+* o *dsx+* podrían controlar distintas respuestas de post-apareamiento. Las neuronas s-LNvs y l-LNvs son encargadas de la correcta sincronización de los distintos grupos neuronales que componen la red circadiana y son necesarias para un correcto ritmo locomotor general. Se caracterizan por ser las únicas que liberan el neuropéptido

PDF (Peng et al., 2003). La liberación circadiana de PDF por parte de las s-LNvs es responsable de la actividad anticipatoria de la mañana, (Renn et al., 1999, Stoleru et al., 2005 Stoleru et al., 2004). Datos de nuestro laboratorio muestran que el apareamiento disminuye los niveles de PDF en las terminales axonales y que esta respuesta se encuentra mediada por las neuronas *ppk+* ya que disminuir la expresión de SPR en estas neuronas en hembras apareadas recupera los niveles de PDF (Riva et al, 2022).

Recientemente se reportó que un grupo de neuronas *ppk+* que se localizan en el cerebro se encuentran activas tras el apareamiento y tienen un rol esencial en la inducción de la puesta de huevos y un rol parcial en la receptividad en respuesta al SP (Nallasivan et al., 2021). Teniendo en cuenta estos antecedentes, que las neuronas encargadas de controlar la anticipación de la mañana (s-LNvs) se encuentran en el cerebro y los resultados obtenidos en este trabajo, que muestran una recuperación de la anticipación en hembras apareadas tras el silenciamiento de las neuronas *ppk+*, podríamos sugerir que el cambio en la actividad anticipatoria se encuentra dado por la activación tras el apareamiento de este subgrupo de neuronas *ppk+* que se encuentra en el cerebro que podrían estar inhibiendo la actividad de las neuronas PDF y no por el silenciamiento de las neuronas *ppk+* pertenecientes al grupo de las SPSN. Sería interesante como primer paso para comprobar esta hipótesis, realizar un experimento en el cual se silencie exclusivamente las neuronas *ppk+* del cerebro y evaluar los niveles de anticipación de la mañana. A su vez se podría realizar mediante inmunofluorescencia y el uso de la línea CaLexA (Masuyama et al., 2012), la medición de los niveles de calcio en las neuronas *ppk+* del cerebro en hembras vírgenes y apareadas, y así inferir niveles de actividad.

La falta de efecto del silenciamiento crónico en los niveles de sueño diurno observado en hembras apareadas, podría deberse a que el sueño a diferencia de la anticipación de la mañana se encuentra regulado por dos mecanismos distintos, el reloj y homeostáticamente (Borbély, 1982; Hendricks et al., 2000; Shaw et al., 2000). Un factor a tener en cuenta cuando se modifica la actividad de un grupo neuronal durante todo el desarrollo es que esto puede inducir cambios homeostáticos para compensar o tratar de devolver a la neurona su actividad normal (Marder and Prinz, 2002; Davis, 2006; Turrigiano, 2008).

5.2 El silenciamiento agudo de las neuronas *ppk+* en hembras apareadas no muestra efectos en los patrones de actividad y sueño.

Luego de los experimentos de inhibición crónica realizados para identificar las funciones que desempeñan las neuronas *ppk+* en los comportamientos de post-cópula, pérdida de anticipación de la mañana/ pérdida del sueño diurno, y los resultados obtenidos y considerando que este tipo de manipulaciones durante todo el desarrollo, pueden ocasionar efectos deletéreos o compensatorios, decidimos evaluar el efecto de la inhibición aguda de las neuronas *ppk+* sobre el patrón locomotor y de sueño en hembras apareadas, con este fin utilizamos el canal termosensible *Shibire*.

No observamos diferencias significativas en el patrón locomotor, ni en el índice de anticipación de la mañana. De igual manera no se observan diferencias significativas en los niveles de sueño diurno.

La falta de efecto observado en este experimento tras el silenciamiento agudo, podría deberse o bien, a que, la inhibición de las neuronas *ppk+* haya sido parcial, por no haber alcanzado una temperatura de restricción suficientemente alta, o a que la inhibición aguda de las neuronas *ppk+* en hembras apareadas no tiene un efecto sobre los parámetros analizados. La falta de un control positivo en este trabajo, para verificar la eficiencia de la inhibición, imposibilita discernir cuál de las dos situaciones mencionadas más arriba, es la que está sucediendo. Para la realización de un control positivo sugerimos los siguientes experimentos: realizar una inmunofluorescencia utilizando el IEGs (*immediate early gene*) Hr38, cuya expresión aumenta de manera rápida y transitoria en relación con la actividad neuronal. En esta técnica se asocia un anticuerpo primario a la proteína Hr38 (anti-Hr38) y un anticuerpo secundario asociado a un fluoroforo que permite inferir la actividad neuronal en relación a los niveles de fluorescencia (Fujita et al., 2013). Otro control de la actividad neuronal podría realizarse mediante el uso de imágenes de calcio (*calcium imaging*). Teniendo en cuenta que el aumento de los niveles de calcio está asociados al aumento de la actividad neuronal se puede expresar un sensor de calcio asociado a un reportero fluorescente (GCaMPs) en las neuronas de interés y evaluar su activación en comparación a sus respectivos controles (Yao et al., 2012).

Proponemos también la repetición de este experimento utilizando una temperatura de restricción más elevada o usando alguna otra herramienta que permita el silenciamiento agudo de estas neuronas. Una posibilidad sería utilizar la técnica GeneSwitch (GS) que permite una modulación tejido específica y temporal (McGuire, Mao, et al., 2004). GS es una fusión del dominio de reconocimiento al ADN de GAL4 al dominio de unión del

ligando del receptor de progesterona humana. La unión de progesterona, o de análogos, como el esteroide RU486, activa el GAL4 permitiendo la activación de genes río abajo de la secuencia UAS. Otra opción sería usar la expresión de la proteína Gal80^{ts} en conjunto con el sistema Gal4. Gal80^{ts} es un inhibidor termosensible de la expresión del Gal4, bajo la temperatura control (20 °C) esta proteína Gal80 se expresa e inhibe la expresión del Gal4, cuando se cambia a la temperatura de restricción (29 °C), el Gal80 se inactiva, permitiendo la expresión del Gal4 y la activación del gen río abajo de la secuencia UAS (McGuire et al., 2004).

5.3 La activación aguda de las neuronas *ppk+* disminuye el índice de anticipación de la mañana.

La imposibilidad de realizar inferencias sobre el experimento de activación crónica de las neuronas *ppk+* en hembras vírgenes, debido a que el control UAS-*NachBac*>+ se comportaba de igual manera que la línea tratada, perdiendo ambas el pico de la tarde, nos llevó a realizar la activación neuronal únicamente en el estadio adulto y por un período de tiempo acotado, con el fin de lograr una evaluación más apropiada del funcionamiento de las neuronas *ppk+* en el control de los comportamiento de post-cópula. Para esto, utilizamos nuevamente la termo-genética, que como mencionamos anteriormente tiene como ventaja disminuir los efectos no deseados que podría tener la activación crónica. Para lograrlo expresamos un canal de termosensible (TrpA) que estimula la actividad neuronal ya que permite el ingreso de Ca²⁺ bajo la temperatura de restricción (Islas, 2017). En este experimento pudimos observar una disminución del índice de anticipación de la mañana en hembras vírgenes, a la vez que un aumento de la actividad tanto diurna como nocturna, que se refleja también en la disminución del sueño (Figura 15-16). Dada la naturaleza nociceptiva de las neuronas *ppk+* (Adams et al., 1998; Zhong et al., 2010) sumado a que estas naturalmente expresan canales TrpA y que han sido vinculadas con la modificación del sueño diurno dado por el aumento de temperatura a través de su conexión con las neuronas relojeras DN1p (Lamaze et al., 2017), sería interesante comprobar lo observado en la actividad locomotora a través de otras técnicas que no sean mediante la sobreexpresión del canal TrpA y el aumento de la temperatura y así descartar un efecto sinérgico. Datos de nuestro laboratorio descartan la posibilidad de utilizar optogenética con este fin, ya que se observa un efecto *startle* en la actividad locomotora dado por los

pulsos de luz roja durante la noche. (Perez, 2022). Una posibilidad interesante sería utilizar la técnica GeneSwitch, mencionado anteriormente, que permite una modulación tejida específica y temporal (McGuire, Mao, et al., 2004).

5.4 Naturaleza química de de las neuronas *ppk+*: Acetilcolina como modulador del sueño dependiente del estado de apareamiento.

El uso de interferencia de RNA (RNAi), para disminuir la expresión de genes involucrados en la biosíntesis y liberación de distintos neurotransmisores, específicamente en las neuronas *ppk+*, permitió la identificación de acetilcolina como candidato liberado por estas neuronas, que tiene su efecto sobre los niveles de sueño diurno (Figura 17B). Más aún, pudimos constatar que este efecto es dependiente del estado de apareamiento, ya que, la inhibición de liberación de acetilcolina en hembras vírgenes no tiene un efecto sobre los niveles de sueño diurno (Figura 18).

La liberación de acetilcolina por parte de las neuronas *ppk+* ha sido vinculada con otras respuestas de post-apareamiento y con el control de sueño (Yoshinari et al., 2020; Seidner et al., 2015; Lamaze et al., 2017). Recientemente se caracterizó que la vía de señalización encargada de inducir el aumento en la producción de células germinales femeninas (huevos) luego del apareamiento, se encuentra mediada por la liberación de acetilcolina por un grupo de neuronas *ppk+* presentes en el oviducto (Yoshinari et al., 2020). Existen evidencias de al menos otro subgrupo de neuronas *ppk+* colinérgicas que se encuentran involucradas en la regulación de sueño homeostático (Seidner et al., 2015). Dentro de las neuronas relojeras que podrían llegar a estar afectando el sueño diurno de las moscas apareadas a través de acetilcolina se encuentran las *pdf+*, ya que estas reciben *inputs* colinérgicos (Duhart et al., 2020). Dado que resultados del laboratorio (Riva et al., 2022) muestran que las neuronas *ppk+* establecen contactos post-sinápticos con las neuronas *pdf+*, este resultado refuerza la hipótesis de una posible conexión funcional entre el estado de apareamiento y el reloj. Se requieren más experimentos para corroborar esta hipótesis, sugerimos realizar un ensayo de estímulo- respuesta asociado a un indicador de calcio, donde buscaríamos activar las neuronas *ppk+* y medir niveles de calcio en las neuronas *pdf+*.

Una observación interesante, respecto a la modulación del sueño por parte de las neuronas *ppk+* es la dualidad de las respuestas observadas al impedir la liberación de vesículas y por ende silenciar su actividad en contraste con la inhibición específica de la liberación de acetilcolina. Mientras que en el primer caso no observamos diferencias en el sueño

diurno, con la segunda estrategia observamos un aumento. Estos resultados sugieren que las neuronas *ppk+* podrían estar contactándose con múltiples regiones del cerebro encargadas de controlar distintas funciones, o bien que existen subpoblaciones de neuronas *ppk+* que expresan distintos neurotransmisores o neuropéptidos.

En cuanto a la anticipación nuestros resultados muestran que la disminución de la expresión de distintos neurotransmisores en las neuronas *ppk+* no produjo una reversión en el índice de anticipación de la mañana en hembras apareadas. Sería importante ampliar este *screen* utilizando distintas líneas de RNAi para los mismos neurotransmisores, dado que la técnica se basa en la expresión de fragmentos de RNA doble cadena, que se unen por complementariedad de bases al ARNm de la proteína de interés. Existen múltiples líneas que interfieren la expresión del mismo gen pero uniéndose en distintas regiones del ARNm, lo cual puede llevar a que existan variaciones en el grado de respuesta según la línea utilizada.

Este resultado también alienta a continuar con la búsqueda de otros posibles neurotransmisores/neuropéptidos liberados por estas neuronas encargados de modificar la anticipación de la mañana. Proponemos dos candidatos que creemos interesantes estudiar: por un lado, MIP (en inglés *Myoinhibitory peptide*), dado que es un ligando alternativo del SPR y que se ha demostrado que media otras respuestas de post-apareamiento a través de su unión al SPR, como la receptividad o la sensibilidad a las poliaminas en hembras apareadas (Jang et al., 2017; Hussain et al., 2016). Así mismo, se ha reportado que existe una diferencia en la expresión de MIP en el cerebro de hembras vírgenes con respecto a hembras apareadas, siendo mayor en estas últimas (Hussain et al., 2016). Así como también existen reportes del papel de los MIPs en la regulación del sueño homeostático, mediante la inhibición de las neuronas *pdf+* a través de la unión del SPR expresado en estas neuronas (Oh et al., 2014).

En segundo lugar, sería interesante analizar si las neuronas *ppk+* liberan octopamina ya que numerosos trabajos previos han revelado que la señalización a través de octopamina está vinculada con distintas respuestas dadas por el apareamiento, como la maduración de los folículos, promoción de la ovulación y generación de las contracciones de los músculos del ovario (Deady and Sun, 2015; Heifetz et al., 2014; Rubinstein, 2013; Lee et al., 2009; Middleton et al., 2006; Rezaval et al., 2014). Así mismo, se ha descrito que las neuronas l-LNvs, uno de los grupos que conforman las neuronas *pdf+*, se caracterizan por presentar receptores de octopamina (Kula-Eversole et al., 2010). Por lo

tanto, sería interesante probar si las neuronas *ppk+* del cerebro liberan octopamina, y si a través de este neuropéptido son capaces de modular la anticipación de la mañana. Se ha demostrado que la co-transmisión de neuropéptidos/neurotransmisores aumenta la flexibilidad y el rango dinámico de señalización dentro de las redes neuronales o incluso las reconfigura y por lo tanto altera las respuestas de la red (Marder, 2012, Nusbaum et al., 2017). Teniendo en cuenta la reversibilidad de las respuestas de post-apareamiento, y el corto plazo en el cual se aprecia la pérdida de la anticipación de la mañana y la siesta (Isaac et al., 2010, Riva et al 2022), se podría explorar la posibilidad de que exista la co-liberación de neurotransmisores/neuropéptidos por parte de las neuronas *ppk+* colinérgicas, y que estas regulen tanto la pérdida de la anticipación de la mañana como la disminución del sueño registrada en este trabajo.

5.5 CONCLUSIÓN FINAL

Los resultados de este trabajo se alinean con el papel ampliamente establecido de las neuronas *ppk+* en controlar distintas respuestas de post-apareamiento (Häsemeyer et al., 2009; H. Lee et al., 2016; Ribeiro & Dickson, 2010; Kubli & Bopp, 2012; Yang et al., 2009). Específicamente muestran que la activación de estas neuronas disminuye la capacidad de anticipar la mañana en hembras apareadas, mientras que su silenciamiento la promueve, reforzando la hipótesis de una conexión directa y funcional entre las neuronas *ppk+* y la red circadiana, probablemente a través de la conexión con las neuronas *pdf+*. Aportando a la idea de que múltiples subgrupos neuronales se encargan de distintos aspectos de las respuestas de post-apareamiento por medio de mecanismos distintos (inhibición-activación). Por último, establece la identidad de al menos un neurotransmisor (acetilcolina) liberado por estas neuronas por señales gatilladas por el apareamiento que tiene un efecto sobre la regulación del sueño diurno, uno de los dos comportamientos de post-cópula de interés en este trabajo.

6 AGRADECIMIENTOS

Se agradece especialmente a mi directora Lorena Franco, a Sebastian Rissau y a mis compañeros de laboratorio Sabrina Riva y Ezequiel Perez por el apoyo tanto en la parte práctica como en la emocional.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Adams, C. M., Anderson, M. G., Motto, D. G., Price, M. P., Johnson, W. A., & Welsh, M. J. (1998). Ripped Pocket and Pickpocket, novel *Drosophila* DEG/ENaC subunits expressed in early development and in mechanosensory neurons. *The Journal of Cell Biology*, *140*(1), 143–152. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.1.143>
- Allada, R., White, N. E., So, W. V., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1998). A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*, *93*(5), 791–804. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81440-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81440-3)
- Alvarez de la Rosa, D., Canessa, C. M., Fyfe, G. K., & Zhang, P. (2000). Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annual Review of Physiology*, *62*(1), 573–594. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.573>
- Beaver, L. M., Gvakharia, B. O., Vollintine, T. S., Hege, D. M., Stanewsky, R., & Giebultowicz, J. M. (2002). Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(4), 2134–2139.
- Bernstein, J. G., Garrity, P. A., & Boyden, E. S. (2012). Optogenetics and thermogenetics: technologies for controlling the activity of targeted cells within intact neural circuits. *Current Opinion in Neurobiology*, *22*(1), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.10.023>
- Blau, J., & Young, M. W. (1999). Cycling *vrille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell*, *99*(6), 661–671. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81554-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81554-8)
- Borbély, A. A. (1982). A two process model of sleep regulation. *Human Neurobiology*, *1*(3), 195–204.

- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, *118*(2), 401–415. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>
- Bunning, E. (1935). Zur Kenntnis der erblichen Tagesperiodizität bei den Primarblättern von *Phaseolus multivorus*. *Jahrb. Wiss. Botan.*, *81*, 411–418.
- Chang, D. C. (2006). Neural circuits underlying circadian behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behavioural Processes*, *71*(2–3), 211–225. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2005.12.008>
- Chapman, T., Bangham, J., Vinti, G., Seifried, B., Lung, O., Wolfner, M. F., Smith, H. K., & Partridge, L. (2003). The sex peptide of *Drosophila melanogaster*: female post-mating responses analyzed by using RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(17), 9923–9928. <https://doi.org/10.1073/pnas.1631635100>
- Chen, P. S., Stumm-Zollinger, E., Aigaki, T., Balmer, J., Bienz, M., & Böhlen, P. (1988). A male accessory gland peptide that regulates reproductive behavior of female *D. melanogaster*. *Cell*, *54*(3), 291–298. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90192-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90192-4)
- Cyran, S. A., Buchsbaum, A. M., Reddy, K. L., Lin, M.-C., Glossop, N. R. J., Hardin, P. E., Young, M. W., Storti, R. V., & Blau, J. (2003). Vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, *112*(3), 329–341. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00074-6)
- Darlington, T. K., Wager-Smith, K., Ceriani, M. F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T. D., Weitz, C. J., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (1998a). Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science (New York, N.Y.)*, *280*(5369), 1599–1603.
- Darlington, T. K., Wager-Smith, K., Ceriani, M. F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T. D., Weitz, C. J., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (1998b). Closing the circadian loop:

- CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5369), 1599–1603. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1599>
- Davis, G. W. (2006). Homeostatic control of neural activity: from phenomenology to molecular design. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 307–323. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135751>
 - Deady, L. D., & Sun, J. (2015). A follicle rupture assay reveals an essential role for follicular adrenergic signaling in *Drosophila* ovulation. *PLoS Genetics*, 11(10), e1005604. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005604>
 - Dove, A. E., Cook, B. L., Irgebay, Z., & Vecsey, C. G. (2017). Mechanisms of sleep plasticity due to sexual experience in *Drosophila melanogaster*. *Physiology & Behavior*, 180, 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.08.020>
 - Duhart, J. M., Herrero, A., de la Cruz, G., Ispizua, J. I., Pérez, N., & Ceriani, M. F. (2020). Circadian structural plasticity drives remodeling of E cell output. *Current Biology: CB*, 30(24), 5040–5048.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.057>
 - Eban-Rothschild, A., & Bloch, G. (2012). Social influences on circadian rhythms and sleep in insects. *Advances in Genetics*, 77, 1–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387687-4.00001-5>
 - Emery, P., So, W. V., Kaneko, M., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 95(5), 669–679. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81637-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81637-2)
 - Ermakova, Y. G., Lanin, A. A., Fedotov, I. V., Roshchin, M., Kelmanson, I. V., Kulik, D., Bogdanova, Y. A., Shokhina, A. G., Bilan, D. S., Staroverov, D. B., Balaban, P. M., Fedotov, A. B., Sidorov-Biryukov, D. A., Nikitin, E. S., Zheltikov, A. M., & Belousov, V. V. (2017). Thermogenetic neurostimulation with single-cell resolution. *Nature Communications*, 8(1), 15362. <https://doi.org/10.1038/ncomms15362>

- Feng, K., Palfreyman, M. T., Häsemeyer, M., Talsma, A., & Dickson, B. J. (2014). Ascending SAG neurons control sexual receptivity of *Drosophila* females. *Neuron*, *83*(1), 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.017>
- Ferguson, C. T. J., O'Neill, T. L., Audsley, N., & Isaac, R. E. (2015). The sexually dimorphic behaviour of adult *Drosophila suzukii*: elevated female locomotor activity and loss of siesta is a post-mating response. *The Journal of Experimental Biology*, *218*(Pt 23), 3855–3861. <https://doi.org/10.1242/jeb.125468>
- Fujita, N., Nagat, Y., Nishiuchi, T., Sato, M., Iwami, M., & Kiya, T. (2013). Visualization of neural activity in insect brain using a conserved immediate early gene, Hr38. *Current Biology: CB.*, *23*(20), 2063–2070. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.051>
- Garbe, D. S., Vigderman, A. S., Moscato, E., Dove, A. E., Vecsey, C. G., Kayser, M. S., & Sehgal, A. (2016). Changes in female *Drosophila* sleep following mating are mediated by SPSN-SAG neurons. *Journal of Biological Rhythms*, *31*(6), 551–567. <https://doi.org/10.1177/0748730416668048>
- Glaser, F. T., & Stanewsky, R. (2007). Synchronization of the *Drosophila* circadian clock by temperature cycles. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *72*(1), 233–242. <https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.046>
- Glossop, N. R. J., Houl, J. H., Zheng, H., Ng, F. S., Dudek, S. M., & Hardin, P. E. (2003). VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron*, *37*(2), 249–261. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00002-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00002-3)
- Grima, B., Chélot, E., Xia, R., & Rouyer, F. (2004). Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, *431*(7010), 869–873.
- Grueber, W. B., Ye, B., Yang, C.-H., Younger, S., Borden, K., Jan, L. Y., & Jan, Y.-N. (2007). Projections of *Drosophila* multidendritic neurons in the central nervous

- system: links with peripheral dendrite morphology. *Development (Cambridge, England)*, 134(1), 55–64. <https://doi.org/10.1242/dev.02666>
- Hall, J. C. (2005). Systems approaches to biological rhythms in *Drosophila*. *Methods in Enzymology*, 393, 61–185. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)93004-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)93004-8)
 - Hardin, P. E., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1990). Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, 343(6258), 536–540.
 - Hardin, Paul E. (2011). Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Advances in Genetics*, 74, 141–173.
 - Häsemeyer, M., Yapici, N., Heberlein, U., & Dickson, B. J. (2009). Sensory neurons in the *Drosophila* genital tract regulate female reproductive behavior. *Neuron*, 61(4), 511–518.
 - Hausmann, I. U., Hemani, Y., Wijesekera, T., Dauwalder, B., & Soller, M. (2013). Multiple pathways mediate the sex-peptide-regulated switch in female *Drosophila* reproductive behaviours. *Proceedings. Biological Sciences*, 280(1771), 20131938. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1938>
 - Helfrich-Förster, C. (2000). 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*, 15(2), 135–154. <https://doi.org/10.1177/074873040001500208>
 - Helfrich-Förster, C., Yoshii, T., Wülbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D., Bachleitner, W., Cusamano, P., & Rouyer, F. (2007). The lateral and dorsal neurons of *Drosophila melanogaster*: new insights about their morphology and function. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72(1), 517–525.
 - Hendricks, J. C., Finn, S. M., Panckeri, K. A., Chavkin, J., Williams, J. A., Sehgal, A., & Pack, A. I. (2000). Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron*, 25(1), 129–138. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80877-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80877-6)

- Hussain, A., Üçpunar, H. K., Zhang, M., Loschek, L. F., & Grunwald Kadow, I. C. (2016). Neuropeptides modulate female chemosensory processing upon mating in *Drosophila*. *PLoS Biology*, *14*(5), e1002455. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002455>
- Isaac, R. E., Li, C., Leedale, A. E., & Shirras, A. D. (2010). *Drosophila* male sex peptide inhibits siesta sleep and promotes locomotor activity in the post-mated female. *Proceedings. Biological Sciences*, *277*(1678), 65–70. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1236>
- Islas, L. D. (2017). *Neurobiology of TRP Channels* (T. L. R. Emir, Ed.). CRC Press.
- Jang, Y.-H., Chae, H.-S., & Kim, Y.-J. (2017). Female-specific myoinhibitory peptide neurons regulate mating receptivity in *Drosophila melanogaster*. *Nature Communications*, *8*(1), 1630. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01794-9>
- Kadener, S., Stoleru, D., McDonald, M., Nawathean, P., & Rosbash, M. (2007). Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes & Development*, *21*(13), 1675–1686. <https://doi.org/10.1101/gad.1552607>
- Kaneko, M., & Hall, J. C. (2000). 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*, *422*(1), 66–94.
- Kitamoto, T. (2001). Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *Journal of Neurobiology*, *47*(2), 81–92. <https://doi.org/10.1002/neu.1018>
- Konopka, R. J., & Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, *68*, 2112–2116.
- Kosaka, T., & Ikeda, K. (1983a). Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *Drosophila*. *Journal of Neurobiology*, *14*(3), 207–225. <https://doi.org/10.1002/neu.480140305>

- Kosaka, T., & Ikeda, K. (1983b). Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets1. *The Journal of Cell Biology*, 97(2), 499–507.
<https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.499>
- Kubli, E., & Bopp, D. (2012). Sexual behavior: how Sex Peptide flips the postmating switch of female flies. *Current Biology: CB*, 22(13), R520-2.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.058>
- Kula-Eversole, E., Nagoshi, E., Shang, Y., Rodriguez, J., Allada, R., & Rosbash, M. (2010). Surprising gene expression patterns within and between PDF-containing circadian neurons in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(30), 13497–13502.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1002081107>
- Lamaze, A., Öztürk-Çolak, A., Fischer, R., Peschel, N., Koh, K., & Jepson, J. E. C. (2017). Regulation of sleep plasticity by a thermo-sensitive circuit in *Drosophila*. *Scientific Reports*, 7, 40304. <https://doi.org/10.1038/srep40304>
- Lee, H., Choi, H. W., Zhang, C., Park, Z.-Y., & Kim, Y.-J. (2016). A pair of oviduct-born pickpocket neurons important for egg-laying in *Drosophila melanogaster*. *Molecules and Cells*, 39(7), 573–579.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0121>
- Lee, H.-G., Rohila, S., & Han, K.-A. (2009). The octopamine receptor OAMB mediates ovulation via Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the *Drosophila* oviduct epithelium. *PloS One*, 4(3), e4716.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004716>
- Lin, Y., Stormo, G. D., & Taghert, P. H. (2004). The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(36), 7951–7957.

- Linné, C. von, & Linné, C. von. (1770). *Caroli Linnaei Archiater. Reg. Medic. ... Philosophia botanica : in qua explicantur fundamenta botanica : cum definitionibus partium, exemplis terminorum [!], observationibus rariorum*. Typis Joannis Thomae nob. de Trattnern.
- Liu, H., & Kubli, E. (2003). Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(17), 9929–9933.
- Marder, E. (2012). Neuromodulation of neuronal circuits: back to the future. *Neuron*, *76*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.010>
- Marder, E., & Prinz, A. A. (2002). Modeling stability in neuron and network function: the role of activity in homeostasis. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *24*(12), 1145–1154. <https://doi.org/10.1002/bies.10185>
- Masuyama, K., Zhang, Y., Rao, Y., & Wang, J. W. (2012). Mapping neural circuits with activity-dependent nuclear import of a transcription factor. *Journal of Neurogenetics*, *26*(1), 89–102. <https://doi.org/10.3109/01677063.2011.642910>
- McGuire, S. E., Mao, Z., & Davis, R. L. (2004). Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in *Drosophila*. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, *2004*(220), 16. <https://doi.org/10.1126/stke.2202004pl66>
- McGuire, S. E., Roman, G., Davis, R. L. (2004). Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. *Trends in Genetics: TIG*.*20*(8).384-391. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.06.012>
- Menegazzi, P., Beer, K., Grebler, V., Schlichting, M., Schubert, F. K., & Helfrich-Förster, C. (2020). A functional clock within the main morning and evening neurons of *D. melanogaster* is not sufficient for wild-type locomotor activity under changing day length. *Frontiers in Physiology*, *11*, 229. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00229>

- Middleton, C. A., Nongthomba, U., Parry, K., Sweeney, S. T., Sparrow, J. C., & Elliott, C. J. H. (2006). Neuromuscular organization and aminergic modulation of contractions in the *Drosophila* ovary. *BMC Biology*, 4(1), 17.
<https://doi.org/10.1186/1741-7007-4-17>
- Minke, B. (2010). The history of the *Drosophila* TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *Journal of Neurogenetics*, 24(4), 216–233.
<https://doi.org/10.3109/01677063.2010.514369>
- Miyasako, Y., Umezaki, Y., & Tomioka, K. (2007). Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, 22(2), 115–126.
<https://doi.org/10.1177/0748730407299344>
- Muraro, N., & Ceriani, M. F. (2014). Circadian rhythms. In *Behavioral Genetics of the Fly (Drosophila Melanogaster)* I.J. Dubnau, ed. (Cambridge Handbooks in Behavioral Genetics (pp. 104–115). Cambridge University Press.
- Muraro, N. I., Pérez, N., & Ceriani, M. F. (2013). The circadian system: plasticity at many levels. *Neuroscience*, 247, 280–293.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.036>
- Nallasivan, M. P., Haussmann, I. U., Civetta, A., & Soller, M. (2021). Channel nuclear pore protein 54 directs sexual differentiation and neuronal wiring of female reproductive behaviors in *Drosophila*. *BMC Biology*, 19(1), 226.
<https://doi.org/10.1186/s12915-021-01154-6>
- Nusbaum, M. P., Blitz, D. M., & Marder, E. (2017). Functional consequences of neuropeptide and small-molecule co-transmission. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(7), 389–403. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.56>
- Oh, Y., Yoon, S.-E., Zhang, Q., Chae, H.-S., Daubnerová, I., Shafer, O. T., Choe, J., & Kim, Y.-J. (2014). A homeostatic sleep-stabilizing pathway in *Drosophila* composed of the sex peptide receptor and its ligand, the myoinhibitory peptide. *PLoS Biology*, 12(10), e1001974. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001974>

- Ouyang, Y., Andersson, C. R., Kondo, T., Golden, S. S., & Johnson, C. H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(15), 8660–8664. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8660>
- Ozkaya, O., & Rosato, E. (2012). The circadian clock of the fly: a neurogenetics journey through time. *Advances in Genetics*, *77*, 79–123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387687-4.00004-0>
- Peng, J., Zipperlen, P., & Kubli, E. (2005). *Drosophila* sex-peptide stimulates female innate immune system after mating via the Toll and Imd pathways. *Current Biology: CB*, *15*(18), 1690–1694. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.048>
- Peng, Y., Stoleru, D., Levine, J. D., Hall, J. C., & Rosbash, M. (2003). *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLoS Biology*, *1*(1), E13. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000013>
- Pfeiffenberger, C., Lear, B. C., Keegan, K. P., & Allada, R. (2010). Processing sleep data created with the *Drosophila* Activity Monitoring (DAM) System. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2010*(11), db.prot5520. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5520>
- Pittendrigh, C. S., & Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *106*(3), 333–355. <https://doi.org/10.1007/bf01417860>
- Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B., & Young, M. W. (1998). double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*, *94*(1), 83–95. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81224-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81224-6)
- Ren, D., Navarro, B., Xu, H., Yue, L., Shi, Q., & Clapham, D. E. (2001). A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5550), 2372–2375. <https://doi.org/10.1126/science.1065635>
- Renn, S. C., Park, J. H., Rosbash, M., Hall, J. C., & Taghert, P. H. (1999). A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe

- abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*, 99(7), 791–802.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81676-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81676-1)
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 647–676.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.647>
 - Rezával, C., Nojima, T., Neville, M. C., Lin, A. C., & Goodwin, S. F. (2014). Sexually dimorphic octopaminergic neurons modulate female postmating behaviors in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 24(7), 725–730.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.051>
 - Rezával, C., Pavlou, H. J., Dornan, A. J., Chan, Y.-B., Kravitz, E. A., & Goodwin, S. F. (2012a). Neural circuitry underlying *Drosophila* female postmating behavioral responses. *Current Biology: CB*, 22(13), 1155–1165.
 - Rezával, C., Pavlou, H. J., Dornan, A. J., Chan, Y.-B., Kravitz, E. A., & Goodwin, S. F. (2012b). Neural circuitry underlying *Drosophila* female postmating behavioral responses. *Current Biology: CB*, 22(13), 1155–1165.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.062>
 - Ribeiro, C., & Dickson, B. J. (2010). Sex peptide receptor and neuronal TOR/S6K signaling modulate nutrient balancing in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 20(11), 1000–1005. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.061>
 - Rideout, E. J., Dornan, A. J., Neville, M. C., Eadie, S., & Goodwin, S. F. (2010). Control of sexual differentiation and behavior by the doublesex gene in *Drosophila melanogaster*. *Nature Neuroscience*, 13(4), 458–466.
<https://doi.org/10.1038/nn.2515>
 - Rubinstein, C. D. (n.d.). *Wolfner Drosophila seminal protein ovulin mediates ovulation through female octopamine neuronal signaling*.
 - Rutila, J. E., Suri, V., Le, M., So, W. V., Rosbash, M., & Hall, J. C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and

transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*, 93(5), 805–814.

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81441-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81441-5)

- Sehgal, A., Price, J. L., Man, B., & Young, M. W. (1994). Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5153), 1603–1606. <https://doi.org/10.1126/science.8128246>
- Seidner, G., Robinson, J. E., Wu, M., Worden, K., Masek, P., Roberts, S. W., Keene, A. C., & Joiner, W. J. (2015). Identification of neurons with a privileged role in sleep homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology: CB*, 25(22), 2928–2938. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.006>
- Shafer, O. T., & Taghert, P. H. (2009). RNA-interference knockdown of *Drosophila* pigment dispersing factor in neuronal subsets: the anatomical basis of a neuropeptide's circadian functions. *PloS One*, 4(12), e8298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008298>
- Shaw, P. J., Cirelli, C., Greenspan, R. J., & Tononi, G. (2000). Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5459), 1834–1837. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1834>
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S. A., Rosbash, M., & Hall, J. C. (1998). The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 95(5), 681–692. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81638-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81638-4)
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J., & Rosbash, M. (2004a). Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature*, 431(7010), 862–868.
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J., & Rosbash, M. (2004b). Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature*, 431(7010), 862–868. <https://doi.org/10.1038/nature02926>

- Stoleru, D., Peng, Y., Nawathean, P., & Rosbash, M. (2005). A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity. *Nature*, *438*(7065), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature04192>
- Sweeney, S. T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H., & O’Kane, C. J. (1995). Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron*, *14*(2), 341–351. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90290-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90290-2)
- Tijsterman, M., & Plasterk, R. H. A. (2004). Dicers at RISC. *Cell*, *117*(1), 1–3. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00293-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00293-4)
- Touitou, Y., & Haus, E. (1992). *Biologic rhythms in clinical and laboratory medicine* (Yvan Touitou & E. Haus, Eds.; 1992nd ed.). Springer. <https://books.google.at/books?id=FWHrCAAAQBAJ>
- Turrigiano, G. G. (2008). The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses. *Cell*, *135*(3), 422–435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.008>
- Vosshall, L. B., Price, J. L., Sehgal, A., Saez, L., & Young, M. W. (1994). Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, timeless. *Science (New York, N.Y.)*, *263*(5153), 1606–1609. <https://doi.org/10.1126/science.8128247>
- Yang, C.-H., Rumpf, S., Xiang, Y., Gordon, M. D., Song, W., Jan, L. Y., & Jan, Y.-N. (2009). Control of the postmating behavioral switch in *Drosophila* females by internal sensory neurons. *Neuron*, *61*(4), 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.021>
- Yao, Z., Macara, A. M., Lelito, K. R., Minosyan, T. Y., & Shafer O. T. (2012). Analysis of functional neuronal connectivity in the *Drosophila* brain. *Journal of Neurophysiology*, *108*(2), 684–696. <https://doi.org/10.1152/jn.00110.2012>
- Yapici, N., Kim, Y.-J., Ribeiro, C., & Dickson, B. J. (2008). A receptor that mediates the post-mating switch in *Drosophila* reproductive behaviour. *Nature*, *451*(7174), 33–37. <https://doi.org/10.1038/nature06483>

- Yoshii, T., Heshiki, Y., Ibuki-Ishibashi, T., Matsumoto, A., Tanimura, T., & Tomioka, K. (2005). Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *The European Journal of Neuroscience*, *22*(5), 1176–1184. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04295.x>
- Yoshinari, Y., Ameku, T., Kondo, S., Tanimoto, H., Kuraishi, T., Shimada-Niwa, Y., & Niwa, R. (2020). Neuronal octopamine signaling regulates mating-induced germline stem cell increase in female *Drosophila melanogaster*. *ELife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.57101>
- Yu, W., & Hardin, P. E. (2006). Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals. *Journal of Cell Science*, *119*(Pt 23), 4793–4795. <https://doi.org/10.1242/jcs.03174>
- Zelle, K. M., Lu, B., Pyfrom, S. C., & Ben-Shahar, Y. (2013). The genetic architecture of degenerin/epithelial sodium channels in *Drosophila*. *G3 (Bethesda, Md.)*, *3*(3), 441–450. <https://doi.org/10.1534/g3.112.005272>
- Zhong, L., Hwang, R. Y., & Tracey, W. D. (2010). Pickpocket is a DEG/ENaC protein required for mechanical nociception in *Drosophila* larvae. *Current Biology: CB*, *20*(5), 429–434. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.057>
- Zimmerman, J. E., Chan, M. T., Jackson, N., Maislin, G., & Pack, A. I. (2012). Genetic background has a major impact on differences in sleep resulting from environmental influences in *Drosophila*. *Sleep*, *35*(4), 545–557. <https://doi.org/10.5665/sleep.1744>