

Departamento Biología
Universidad Autónoma de Madrid

**Implicación de la corriente Ih en el
mantenimiento de los niveles de Dopamina,
el sueño y la modulación de la actividad en
*Drosophila melanogaster***

Memoria de Tesis doctoral presentada ante la Facultad de Ciencias,
de la Universidad Autónoma de Madrid, por

Alicia Gonzalo Gómez

para la obtención del título de Doctora
en el programa de Doctorado Oficial en Biología Celular y Genética.

Trabajo dirigido por

Dr. Inmaculada Canal Beltrán

Dr. Isabel Molina Balsa

Madrid, Abril de 2012

INDICE

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
1. LA CORRIENTE <i>I_h</i>	9
2. DOPAMINA	14
2.1. DOPAMINA Y RITMICIDAD CIRCADIANA	16
3. SUEÑO	19
4. ACTIVIDAD	24
4.1. UNIÓN NEUROMUSCULAR LARVARIA	24
4.1.1. FISIOLÓGÍA DE LA NMJ LARVARIA	26
4.1.2. IMPLICACIONES DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA EN EL DESARROLLO DE LA NMJ LARVARIA.	28
4.2. MOVILIDAD EN LARVA III.....	30
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. LÍNEAS DE MOSCAS UTILIZADAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	31
2. GENERACIÓN DE MUTANTES PARA <i>Dmlh</i>	32
2.1. GENERACIÓN DE MUTANTES NULOS	32
2.1.1. VALIDACIÓN: PCR	33
2.2. GENERACIÓN DE MUTANTES DIRIGIDOS. RNA INTERFERENTE	34
3. LOCALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>Dmlh</i>	35
3.1. HIBRIDACION “ <i>IN SITU</i> ” DE RNA.....	35
3.2. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE <i>I_h</i> EN CELULAS DOPAMINERGICAS	36
3.2.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS: FLOURESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS)	36
3.2.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE <i>I_h</i> EN LAS CÉLULAS TH AISLADAS.....	37
4. ENSAYO DE LONGEVIDAD	37
5. ENSAYO DE ESTRÉS OXIDATIVO	37
6. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE DOPAMINA	38
6.1. EXTRACCIÓN DE DOPAMINA.....	38

6.1.1. CABEZAS DE INDIVIDUOS ADULTOS	38
6.1.2. CEREBROS DE INDIVIDUOS ADULTOS	38
6.2. CUANTIFICACIÓN DE DOPAMINA Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS	39
7. ENSAYOS DE LOCOMOCIÓN EN ADULTO: TRIKINETICS	39
7.1. ESTUDIO DEL PATRON DE LOCOMOCIÓN	39
7.2. ESTUDIO DE LA RITMICIDAD A BAJA INTENSIDAD DE LUZ (ENSAYO DE FOTOSENSIBILIDAD)	40
7.3. ESTUDIO DE SUEÑO/ACTIVIDAD	40
7.3.1. PAPILLA ESTÁNDAR	40
7.3.2. APLICACIÓN DE DROGA (3IY)	41
7.4. ESTUDIO DE LA RITMICIDAD EN LD Y DD	41
8. INMUNODETECCION DE PDF	42
9. ENSAYOS EN LARVA III	42
9.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA TERMINACIÓN NEUROMUSCULAR LARVARIA ...	42
9.2. ESTUDIO DE LOCOMOCIÓN EN LARVAIII.....	43
9.2.1. ANÁLISIS DEL MOVIMIENTO LIBRE DE LARVA III.....	43
9.2.2. ANÁLISIS DEL MOVIMIENTO PERISTÁLTICO	44
9.3. ELECTROFISIOLOGÍA DE LA NMJ LARVARIA.	44
9.3.1. REGISTRO DE LOS POTENCIALES POSTSINÁPTICOS EXCITATORIOS MINIATURA (EJ _{Pm}).....	44
9.3.2. REGISTRO DE LOS POTENCIALES EVOCADOS (EJP).....	44
9.3.3. APLICACIÓN DE ZD7288	45

RESULTADOS

1. GENERACION Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES PARA <i>Ih</i>	46
1.1. GENERACION DE MUTANTES NULOS (FLIP-OUT).....	46
2. ESTUDIOS DE LOS NIVELES DE DOPAMINA	50
2.1 LAS CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS DE <i>Drosophila</i> EXPRESAN <i>Dmlh</i>	50
2.2. LA DOPAMINA OSCILA DIARIA Y CIRCADIANAMENTE EN CABEZAS DE INDIVIDUOS CONTROL.....	51

2.3 LA AUSENCIA DE CORRIENTE I_h AFECTA A LA OSCILACION DE DA EN PRESENCIA DE LUZ	54
2.4. LA AUSENCIA DE CORRIENTE I_h INCREMENTA LOS NIVELES DE DOPAMINA EN DD55	
3. DA Y PATRON DE LOCOMOCIÓN	57
3.1. EL PATRON DE DOPAMINA PARECE ESTAR INTIMAMENTE ASOCIADO AL PATRON DE ACTIVIDAD.....	57
4. ESTUDIO DEL PATRON DE SUEÑO Y VIGILIA EN ADULTOS	60
4.1. LA AUSENCIA DE CORRIENTE I_h PROVOCA UNA FRAGMENTACIÓN DEL SUEÑO .	60
4.2. DISMINUIR LOS NIVELES DE DOPAMINA EN MUTANTES <i>Dmlh</i> RESCATA LA FRAGMENTACIÓN DEL SUEÑO	62
4.3. ELIMINAR LA CORRIENTE I_h EN MOTONEURONAS RESULTA EN FENOTIPO HIPOACTIVO	64
5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD EN LARVA III	66
5.1. ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA DE LA NMJ EN MUTANTES NULOS PARA <i>Dmlh</i>	66
5.2. LA CORRIENTE I_h ESTÁ IMPLICADA PRE Y POST-SINAPTICAMENTE EN EL DESARROLLO DE LA NMJ	68
5.3. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO LOCOMOTOR.....	69
5.4. ESTUDIO DE ELECTROFISIOLOGÍA EN LA NMJ.....	71
5.4.1. BLOQUEAR LA CORRIENTE I_h REDUCE LA RESPUESTA DE LA NMJ AFECTANDO A LAS MOTONEURONAS.....	73
6. ESTUDIO DE LA RITMICIDAD CIRCADIANA.....	75
6.1. LOS INDIVIDUOS <i>Dmlh</i> - SON RÍTMICOS EN CONDICIONES DE LD.....	75
6.2. EN AUSENCIA DE ESTÍMULO AMBIENTAL, LOS INDIVIDUOS MUTANTES NULOS <i>Dmlh</i> PIERDEN RITMICIDAD Y ACORTAN EL PERIODO.	76
6.3. LA CORRIENTE I_h AFECTA DOWSTREAM PDF.....	78
6.4. LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>Dmlh</i> OSCILA DENTRO DEL INTERVALO CIRCADIANO	80
DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXO.....	103

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura del canal HCN

Figura 2. Las múltiples funciones de *I_h* sobre la actividad neuronal dependen del contexto y la localización subcelular.

Figura 3. La corriente *I_h* tiene un doble efecto sobre los EPSP mediante interacción con la corriente *I_m*

Figura 4. Síntesis de Dopamina en *Drosophila melanogaster*

Figura 5. Neuronas dopaminérgicas en el cerebro adulto de *Drosophila* visualizadas con *Gal4>UAS-mCD8::GFP*

Figura 6. Las neuronas *l-LNvs* y dopaminérgicas establecen contactos de membrana

Figura 7. Tanto el gen *pale* como el receptor *D2-like* de dopamina oscilan en *Drosophila*

Figura 8. Sueño en mutantes *Sh* (*miniesleep*, *mns*).

Figura 9. Los mutantes *fnn* presentan elevados niveles de actividad total, aunque sin incremento de la actividad por minuto, y reducidos niveles de sueño

Figura 10. Organización general de los músculos y la terminación neuromuscular larvaria de *Drosophila*

Figura 11. Morfología de la NMJ larvaria en mutantes de excitabilidad

Figura 12. Esquema de los tres tipos de transposones empleados para generar deleciones basadas en *FLP-FRT*

Figura 13. Recombinación basada en *FRT-FLP*

Figura 14. Validación del mutante nulo *DmIh*

Figura 15. La ausencia de *I_h* acorta la esperanza de vida pero no afecta a la resistencia frente a estrés oxidativo

Figura 16. El gen *DmIh* se expresa en las neuronas dopaminérgicas

Figura 17. La dopamina oscila de manera circadiana en moscas control

Figura 18. La falta de corriente *Ih* altera los niveles de dopamina

Figura 19. Los mutantes *DmIh* pierden el patrón bimodal característico de LD

Figura 20. Los mutantes nulos *DmIh* son capaces de percibir luz a baja intensidad

Figura 21. La ausencia de *Ih* afecta a la consolidación del sueño

Figura 22. Disminuir los niveles de dopamina en mutantes *DmIh*, mediante 3IY, rescata el fenotipo de sueño

Figura 23. Eliminar la corriente *Ih* en las motoneuronas genera hipoactividad tanto en día como en noche

Figura 24. La ausencia de corriente *Ih* provoca un fenotipo de hipoexcitabilidad en la NMJ larvaria

Figura 25. Expresión de *DmIh* en el músculo de larva III.

Figura 26. Los mutantes nulos *DmIh* presentan defectos en la locomoción de larva III, provocados por la ausencia de la corriente *Ih* en las motoneuronas y/o el sistema nervioso central

Figura 27. Electrofisiología de la NMJ larvaria

Figura 28. Bloquear la corriente *Ih* en el terminal sináptico, pero no es en músculo, disminuye la amplitud del EJP

Figura 29. Los mutantes *DmIh* son rítmicos en condiciones LD

Figura 30. En DD, los mutantes *DmIh* acortan el periodo circadiano

Figura 31. La ausencia de *Ih* no altera la oscilación de PDF en los terminales de las LNvs en condiciones de DD

Figura 32. La expresión del gen *DmIh* oscila

Tabla 1. Parámetros circadianos

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

AMPC: Adenosin Monofosfato cíclico

BCIP: sal 5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato p-toluidina

cDNA: DNA complementario

DA: Dopamina

DD: Oscuridad constante (dark-dark)

DNs: Neuronas Dorsales

DNA: Acido Desoxirribunocleico

DmIh: gen *Ih* en *Drosophila*

EPSP: Potencial Post-sináptico
Excitatorio

FACS: Fluorescence Activated Cell
Sorting

GFP: Proteína Fluorescente Verde

LD: Luz-Oscuridad (light-dark)

LNds: Neuronas laterales dorsales

LNvs: Neuronas laterales ventrales

NBT: Nitro-blue Tetrazolium Chloride

NMJ: Unión Neuromuscular

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la
polimerasa

PDF: Factor Dispersante de Pigmento

Q: Contenido Cuantal

RT-PCR: reacción reversa en cadena de
la polimerasa

RNA: Ácido ribunocleico

RNA_m: Acido Ribunocleico mensajero

SEM: Desviación Estándar de la Media

SNC: Sistema nervioso central

TH: Tirosina Hidroxilasa

UAS: Secuencia activadora de levaduras
(Upstream Activated Sequence)

3IY:3-Iodotirosina

RESUMEN

La excitabilidad celular es un parámetro estrechamente regulado y dependiente principalmente de corrientes que operan cerca del potencial de reposo de la célula. Las dificultades en el estudio de estas corrientes se ven agravadas por la existencia en mamíferos de múltiples genes que codifican distintas subunidades de un único tipo de canal. Cada vez es mayor el número de enfermedades del sistema nervioso relacionadas con el mal funcionamiento de un canal iónico (canalopatías), y aunque existen terapias farmacológicas que tienen como diana canales iónicos específicos, la complejidad funcional de éstos y, en algunos casos, la ausencia de bloqueantes específicos de isoforma, explica que muchos de estos fármacos tengan serios efectos secundarios. Nuestro objetivo es profundizar en el entendimiento de la implicación de una de las corrientes subumbrales, la corriente I_h , en la regulación de comportamientos complejos y ahondar en las consecuencias de eliminar dicha corriente utilizando para ello *Drosophila melanogaster* como modelo animal más sencillo, y con un único gen para este canal (*DmIh*). La corriente I_h se ha denominado corriente marcapasos porque juega un papel fundamental en el control de la actividad rítmica espontánea de una variedad de células excitables, incluyendo las neuronas dopaminérgicas. Hemos generado un mutante nulo para la corriente I_h en *Drosophila*, y hemos demostrado que la falta de esta corriente modifica la oscilación circadiana de dopamina. Los mutantes *DmIh* tienen alterado el patrón de sueño-vigilia, y también los parámetros de actividad. Además, estas moscas presentan defectos en los ritmos circadianos, un proceso también mediado por actividad neuronal marcapasos.

INTRODUCCIÓN

1. LA CORRIENTE I_h

La corriente I_h fue identificada por primera vez en mamíferos, en células del nodo senoauricular cardiaco (Zhang et al., 2003). Esta corriente depende de un canal de potasio del tipo HCN (canal de potasio activado por hiperpolarización y unión a nucleótido cíclico) permeable a Na^+ y K^+ , y participa en corrientes marcapasos en células cardiacas y nerviosas (Meldrum and Rogawski, 2007).

Cada subunidad del canal contiene 6 dominios transmembrana, una región de poro y extremos C y N citosólicos (Figura 1). El extremo carboxilo además contiene una región de unión a AMP cíclico (dominio CNBD) homóloga a las regiones de unión a nucleótido cíclico de otras proteínas, incluidos canales activados por los mismos (Zagotta and Siegelbaum, 1996). La activación presináptica de adenilil ciclase y la consecuente generación de AMPc representa un importante mecanismo de modulación de la transmisión sináptica (Beaumont and Zucker, 2000). La unión directa a AMPc, cambia la dependencia de voltaje del canal I_h a potenciales menos hiperpolarizados facilitando así la apertura del canal (Meldrum and Rogawski, 2007).

En mamíferos existen 4 genes que codifican para el canal I_h (HCNs: HCN1-HCN4). Cada gen codifica una subunidad que puede formar canales homoméricos o heteroméricos con diferentes propiedades funcionales (Notomi and Shigemoto, 2004). La expresión de cada gen HCN es fundamentalmente específica de cada tejido, aunque con cierto grado de solapamiento. Así HCN1 y HCN2 son

predominantes en el sistema nerviosos central y en la retina, mientras que HCN4 se expresa básicamente en el corazón (Barrow and Wu, 2009; Postea and Biel, 2011).

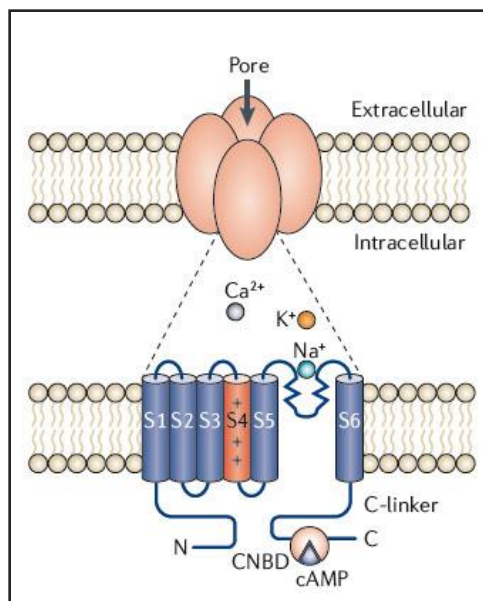


Figura 1. Estructura del canal HCN.
Modificada de (Postea & Biel, 2011).

El análisis del genoma de *Drosophila* revela la presencia de un único gen que codifica para el canal Ih (*Dmlh*) pero que es capaz de generar, al menos 12 isoformas diferentes por *splicing* alternativo. Se clasifican atendiendo a la longitud de su región N-terminal y al uso alternativo del sitio de *splicing* 5' en el exón 7 o 9 (Gisselmann et al., 2005).

En *Drosophila*, la expresión de *Dmlh* parece ser panneuronal (Marx et al., 1999), aunque no hay estudios tan detallados como en mamíferos debido, fundamentalmente, a la falta de anticuerpos eficaces para su detección. También se ha detectado expresión en la aorta (Monier et al., 2005).

A diferencia de otras corrientes activadas por voltaje, Ih se activa en hiperpolarización, pero permanece parcialmente activa a potenciales próximos al umbral, provocando un constante efecto despolarizante que funciona como un

estabilizador frente a alteraciones del potencial de membrana. Aunque el efecto esperado de la activación de esta corriente, *a priori*, sería provocar un incremento en la excitabilidad de la membrana, se ha descrito que el efecto neto que produce su activación sobre la excitabilidad celular depende de muchos factores (Noam et al., 2011), entre ellos de su localización subcelular (Figura 2).

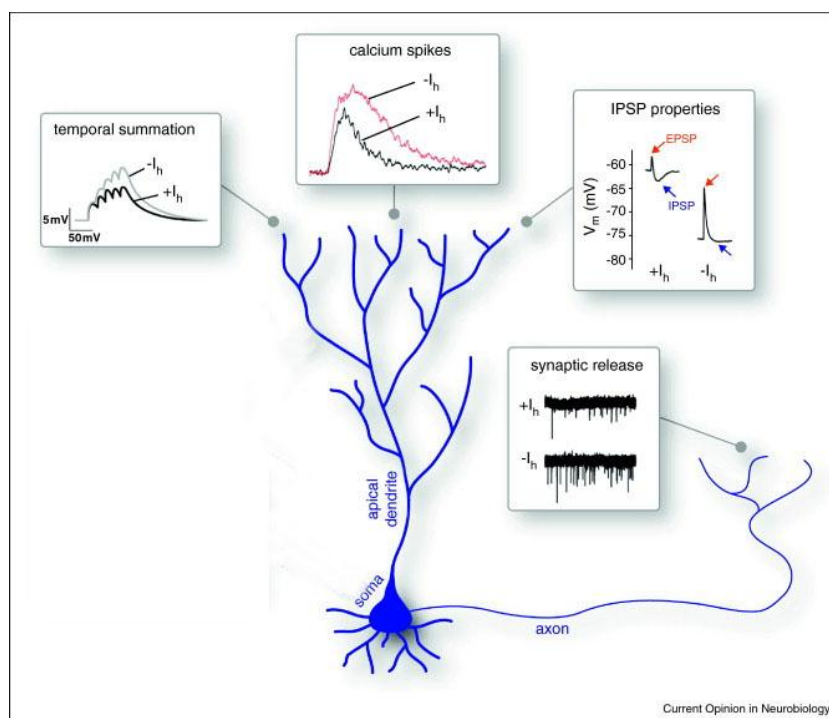


Figura 2. Las múltiples funciones de I_h sobre la actividad neuronal dependen del contexto y la localización subcelular. Esquema de una neurona representando las principales funciones de I_h en distintos dominios subcelulares. En las dendritas, I_h reduce la sumación temporal, reduce la amplitud de las espigas de Ca^{2+} y hace que los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPs) pasen de tener un efecto meramente cortocircuitador a uno hiperpolarizante. En axones, I_h reduce la liberación sináptica. Modificado de (Noam et al., 2011).

A nivel de membrana post-sináptica se han descrito múltiples efectos de I_h sobre la regulación de la excitabilidad dendrítica. En las dendritas de neuronas piramidales CA1 de hipocampo de ratón, el canal HCN, se distribuye de una manera no uniforme formando un gradiente desde la región distal a la proximal. Este gradiente es el

encargado de normalizar las señales que recibe desde diferentes localizaciones dendríticas, haciendo que la sumación temporal que se produce en el soma celular sea independiente de la localización del *input* presináptico (Figura 2) (Magee, 1999). Los modelos computacionales de neuronas CA1 de ratón que se han desarrollado para analizar las respuestas a distintos estímulos presinápticos, también han mostrado que, bloquear la corriente I_h mediante ZD7288 (un bloqueante específico del canal HCN), provoca diferentes respuestas en función de la amplitud del estímulo aplicado (Figura 3A), de manera que la corriente I_h incrementa la excitabilidad celular frente a *inputs* de intensidad baja y la disminuye cuando la intensidad es elevada. Este doble efecto de la corriente I_h implica interacciones con otras corrientes iónicas. En concreto, se ha descrito la existencia de una interacción con la corriente repolarizante de K^+ I_m que opera a potenciales cercanos al reposo, y que es activada por la lenta despolarización provocada por la corriente I_h (Figura 3B) (George et al., 2009).

A nivel presináptico, se ha descrito que la despolarización mediada por la corriente I_h inhibe a los canales de Ca^{2+} tipo T de los terminales de las neuronas del cortex entorhinal de ratón, provocando una disminución en la liberación de neurotransmisor (Huang et al., 2011). Sin embargo, en interneuronas, no está claro si juega un papel similar o, por el contrario, actúa como facilitador de la liberación sináptica (Aponte et al., 2006).

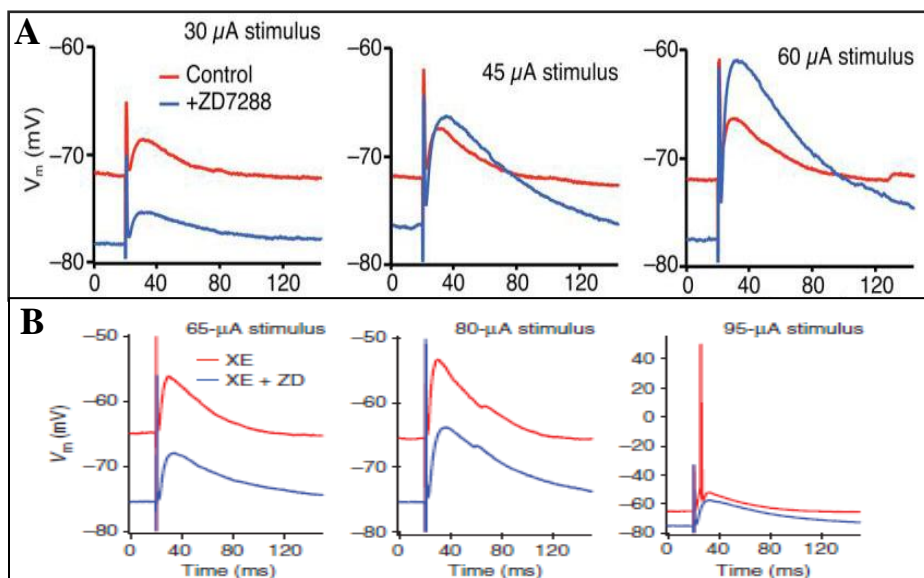


Figura 3. La corriente I_h tiene un doble efecto sobre los EPSP mediante interacción con la corriente I_m . A. Registros representativos de la respuesta a tres estímulos de intensidades crecientes bajo condiciones control (rojo) y en presencia de ZD7288 (10 μ M) (azul). B. Registros representativos de la respuesta a tres estímulos crecientes bloqueando la corriente I_m mediante XE991 (10 μ M) (rojo) o bloqueando ambas corrientes (XE+ZD, azul). En todos los casos, I_h tiene un efecto excitatorio. De hecho, el estímulo de máxima intensidad (95 μ A) dispara un potencial de acción sólo en presencia de I_h . Modificado de (George et al., 2009)

Por tanto, es difícil predecir el efecto de alterar la corriente I_h , puesto que su repercusión depende del contexto fisiológico. Además, neuromoduladores como la serotonina y la dopamina generan AMPc por lo que son capaces de modular de forma indirecta a esta corriente (Beaumont and Zucker, 2000). En este sentido, los canales HCN no sólo parecen estar regulados por aminas sino que, en mamíferos además, se expresan en las propias células dopaminérgicas, donde diversos estudios han mostrado que la corriente I_h es un componente determinante de la tasa de disparo de estas neuronas, aunque el efecto sobre la liberación de dopamina resultante no ha sido registrado (Chu and Zhen, 2010).

2. DOPAMINA

La dopamina (DA) es una catecolamina implicada en la modulación sináptica y la plasticidad comportamental en una gran variedad de animales, actuando como neuromodulador, tanto en vertebrados como invertebrados.

En *Drosophila* se sintetiza a partir del aminoácido tiroxina, que a través de la enzima Tiroxina-hidroxilasa (TH, enzima limitante del proceso, codificada por el gen *pale*) se transforma en L-DOPA, el precursor de la dopamina. A continuación la L-DOPA es procesada por la enzima Dopa-Decarboxilasa (DDC, codificada por el gen *Ddc*) dando lugar a la DA (Figura 4) (Monastirioti, 1999; Hardie and Hirsh, 2006).

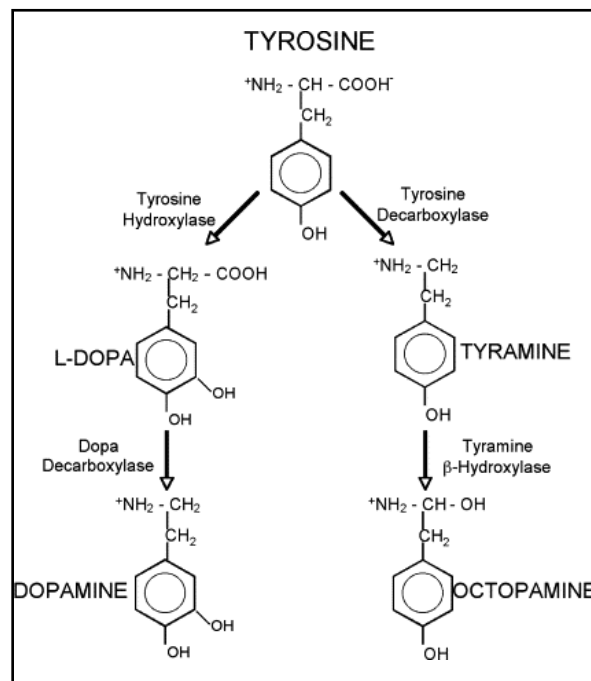


Figura 4. Síntesis de Dopamina en *Drosophila melanogaster*. Modificado de (Hardie & Hirsh, 2006)

La expresión de la dopamina en el cerebro adulto de *Drosophila* se restringe a aproximadamente 127 neuronas (reconocidas por la expresión de GFP dirigida por

TH-Gal4) comprendidas en 13 grupos bilateralmente simétricos, a excepción de PPM1 que se posiciona a lo largo de la línea media (Figura 5). Estos grupos celulares envían proyecciones principalmente hacia los *mushroom bodies*, (Figura 5) (Mao and Davis, 2009).

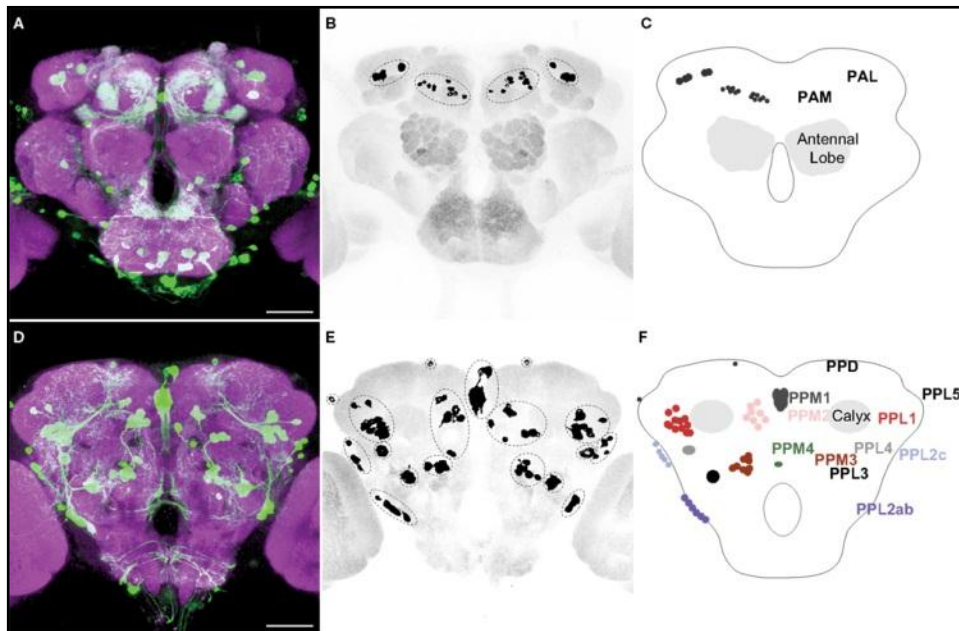


Figura 5. Neuronas dopaminérgicas en el cerebro adulto de *Drosophila* visualizadas con *Gal4>UAS-mCD8::GFP*. **A-C.** Vista anterior. **D-F.** Vista posterior. **A y D.** Tinción con anti-GFP (verde) mostrando los cuerpos celulares y proyecciones de las células TH. El cerebro fue contrateñido con anti-nc82 (magenta). Barra de escala, 50µm. **B y E.** Procesamiento de las imágenes mostradas en A y D resaltando los cuerpos celulares. **C y F.** Diagrama de B y E, indicando el nombre, la localización y el número de células de cada grupo en el protocerebro (Mao & Davis, 2009).

Mediante *splicing* alternativo *pale* (*ple*) produce dos isoformas distintas de TH. TH1 se expresa selectivamente en las neuronas descritas del sistema nervioso central, mientras que TH2 se expresa en tejidos periféricos no nerviosos, los cuales incluyen las células hipodérmicas que secretan la matriz cuticular (Riemensperger et al., 2011), de manera que la dopamina y su precursor L-DOPA, son importantes intermediarios de la esclerotización de la cutícula. De hecho, los mutantes nulos para *pale* son letales en estadios embrionarios tardíos (Monastirioti, 1999).

Además de su función en la esclerotización de la cutícula, la DA también está íntimamente implicada en una amplia gama de comportamientos que van desde el sueño y la locomoción, al cortejo y el aprendizaje (Van Swinderen and Andretic, 2011). Cuando se somete a las moscas a un incremento en los niveles de dopamina, mediante la aplicación de drogas (METH, cafeína, cocaína), o mediante mutaciones en su transportador DAT (mutante *fumin*), los niveles de sueño disminuyen. En el caso contrario, mutantes para el receptor de dopamina dDA1 (mutantes *dumb¹* y *dumb²*), resultan en un fenotipo de hiperinsomnio (Van Swinderen and Andretic, 2011).

Del mismo modo actividad y dopamina también están correlacionadas en *Drosophila*. Sin embargo es necesario diferenciar entre actividad endógena (actividad propia del individuo) y exógena (respuesta frente a estímulos). En este sentido parece que, frente a la actividad endógena, la dopamina mantiene una relación directa en la que incrementar sus niveles, incrementa la actividad. Sin embargo, variar los niveles de dopamina tiene diferente efecto en la respuesta en función del tipo de estímulo externo. Mutantes para DAT, son hipersensibles a estímulo mecánico, mientras que la aplicación de METH provoca una disminución de la respuesta a estímulo visual, siendo ambos casos, individuos mutantes con niveles de DA incrementados. Lebestky et al. (Lebestky et al., 2009) propusieron que el efecto de la dopamina en ambos tipos de actividad (endógena y exógena), así como en el aprendizaje y la memoria, respondía a diferentes roles de este neuromodulador. Cada región innervada por células dopaminérgicas está subdividida en grupos recibiendo eferencias de distintos subtipos de células dopaminérgicas, de manera que la dopamina podría estar modulando diferencialmente distintos comportamientos (Van Swinderen and Andretic, 2011).

2.1. DOPAMINA Y RITMICIDAD CIRCADIANA

En el cerebro de adulto, no existe colocalización entre las células del reloj (Figura 6A) y TH (Hamasaka and Nässel, 2006). Sin embargo, las neuronas dopaminérgicas

(visualizadas mediante THG4;UAS:GFP) PPL2 tienen terminaciones en las células LNvs, tanto en los cuerpos celulares, como en las dendritas, aunque no se encontró señal en los lóbulos ópticos donde se localizan los axones de las l-LNvs (Figura 6B) (Shang et al., 2011). Además, hay terminaciones dopaminérgicas (TH-Inmunoreactivas) en la región dorsal cerca de las proyecciones de las neuronas DNs y LNds, y en la capa distal de la médula superpuestas con las de células *tim*-inmunoreactivas (Hamasaka and Nässel, 2006).

Las neuronas LNvs son un importante punto de control de la ritmicidad circadiana. De hecho, junto con las LNds, son necesarias y suficientes para el mantenimiento de ritmos locomotores en ausencia de estímulos ambientales (Frisch et al., 1994; Helfrich-Förster, 1998; Renn et al., 1999) y para el funcionamiento normal en condiciones de luz-oscuridad (LD) (Renn et al., 1999). Estas neuronas, que emergen como importantes coordinadoras, expresan PDF (*Pigment Dispersing Factor*), el principal output del reloj circadiano en *Drosophila* (Helfrich-Förster et al., 2007), requerido para el mantenimiento de los ritmos de locomoción tanto en condiciones de LD como en ausencia de estímulo ambiental (DD) (Shafer et al., 2006).

La liberación de PDF es rítmica tanto diurna (condiciones de LD) como circadianamente (DD) en los terminales que las neuronas s-LNvs emiten hacia el protocerebro dorsal, siendo máxima al inicio del día (ZT/CT 2) y mínima al inicio de la noche (ZT/CT 14). La correcta regulación de la liberación y señalización de PDF, parece crítica para asegurar que las múltiples neuronas del reloj formen un sistema coordinado y producir un comportamiento locomotor robusto y rítmico (Frisch et al., 1994; Nitabach et al., 2006; Fernández et al., 2008).

Existe, además, una relación funcional entre las células LNvs y dopaminérgicas. La aplicación de dopamina en disgregados celulares de LNvs es capaz de provocar un incremento en los niveles de Ca^{2+} de estas células sugiriendo un efecto de la DA sobre las mismas (Wegener et al., 2004), y un posible papel de la dopamina en la regulación circadiana.

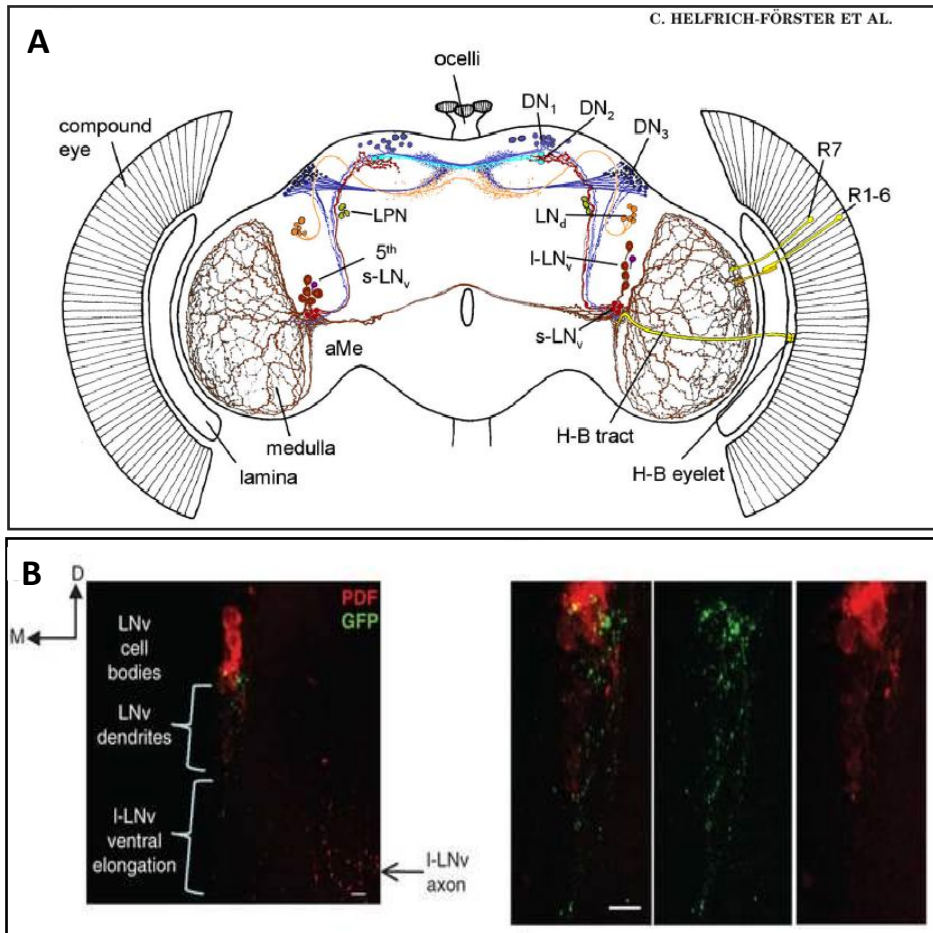


Figura 6. Las neuronas *l-LNvs* y dopaminérgicas establecen contactos de membrana. A. Esquema de los grupos celulares implicados en el reloj circadiano en cerebro de adulto de *Drosophila* (Helfrich-Förster y et al., 2007). **B.** Visualización de proyecciones de neuronas dopaminérgicas (GFP, verde) y de neuronas *LNvs* (rojo). Se ve señal de GFP alrededor de los cuerpos celulares y dendritas de las neuronas *LNvs*, pero no alrededor de los axones de *l-LNvs*. El diagrama indica la orientación del cerebro. En la imagen de la derecha se muestra en detalle de la región del soma y dendritas de las *LNvs*. Barra de escala, 10 μ m. Modificado de (Shang et al., 2011).

En rata se ha descrito una oscilación circadiana de los niveles de dopamina, al menos en el *nucleus accumbens* y en el *striatum*. Sin embargo, en *Drosophila*, al inicio de este trabajo, no existían evidencias directas de dicha oscilación. Si se habían descrito, en cambio, oscilaciones en la expresión del gen *pale* (Ceriani et al., 2002), así como

en la respuesta del receptor de dopamina D2-like (Figura 7) (Andretic and Hirsh, 2000).

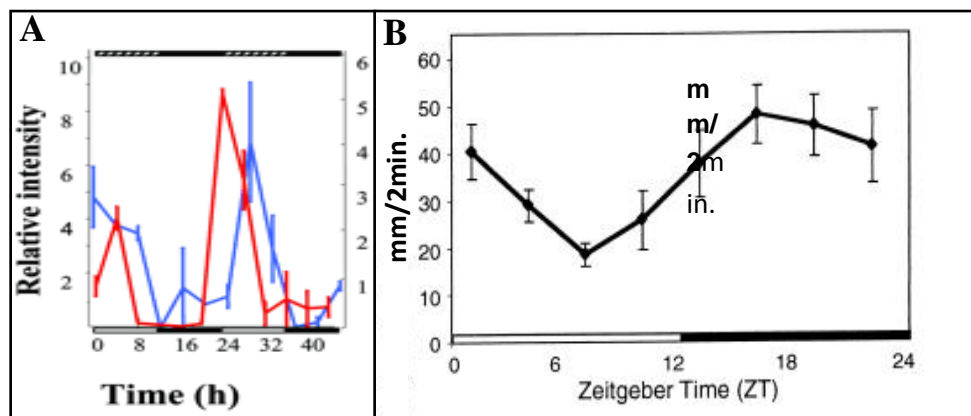


Figura 7. Tanto el gen pale como el receptor D2-like de dopamina oscilan en Drosophila. **A.** Expresión del gen pale (en cabeza y cuerpo) a lo largo de dos días consecutivos, bajo condiciones de LD (rojo) y en ausencia de estímulo ambiental (DD, azul). Modificado de (Ceriani et al., 2002). **B.** Locomoción inducida por respuesta diferencial al quinpirol (agonista del receptor de dopamina D2-like) en moscas decapitadas, en condiciones de LD. Los datos representan la media de locomoción (mm recorridos cada 2-minutos) de 30-50 moscas. Modificado de (Andretic & Hirsh, 2000).

3. SUEÑO

En mamíferos, el sueño consiste en un estado de disminución de actividad fisiológica que es distinguible de la inactividad, tanto comportamental como electrofisiológicamente. La falta de sueño se compensa con intentos posteriores para recuperar el sueño perdido, un fenómeno conocido como homeostasis del sueño. Aunque el estado de sueño podría parecer un estado vulnerable, existe en todas las especies estudiadas y está íntimamente asociado con procesos de aprendizaje y memoria (Harbison et al., 2009).

En mamíferos, el sueño está controlado por procesos circadianos y homeostáticos. Lesiones en el núcleo supraquiasmático, provocan defectos en la consolidación del sueño (Cirelli, 2009). Además, el sueño en mamíferos se caracteriza por mostrar una regulación homeostática, independiente de la regulación circadiana, y por el

incremento en los umbrales de respuesta a estímulos. Además puede ser regulado por estimulantes e hipnóticos (Shaw et al., 2000).

En *Drosophila* parece complicado distinguir sueño de inactividad. Sin embargo se ha demostrado que el sueño en moscas muestra todas las características fundamentales del sueño en mamíferos. Sometiendo moscas a un estímulo vibratorio de intensidad creciente, los umbrales de respuesta de aquellas que estaban despiertas eran más bajos que las que se encontraban en un estado quiescente de 5 o más minutos, demostrando que estas ausencias de movimiento tenían el incremento de umbral de respuesta característico del sueño de mamíferos. Además, también mantienen una regulación homeostática ya que, moscas privadas de sueño durante las 12 horas de la fase de noche muestran, durante las siguientes 12 horas de fase de día, un claro incremento de los niveles de sueño. Del mismo modo, la aplicación de cafeína y hidroxicina, tienen un efecto en el patrón de sueño-vigilia en *Drosophila* (Shaw et al., 2000).

Bajo estos criterios, el sueño en moscas se definió como periodos de inactividad iguales o superiores a 5 minutos, los cuales están asociados a un incremento en los umbrales de respuesta, tanto durante la fase de luz como de oscuridad (Cirelli et al., 2005). De este modo se determinó que, en moscas control, el tiempo dedicado a dormir oscila entre 9 y 15 horas por día, preferentemente durante la noche (Figura 8) (Cirelli et al., 2005) donde los episodios de sueño tienen mayor duración, al menos en moscas jóvenes. En este sentido Kho et al. (Koh et al., 2006) demostraron que, en *Drosophila*, también existe fragmentación del sueño asociada a la edad, consistente en un incremento del número de episodios de sueño con reducción de su duración. Además señalaron que este fenotipo es debido a un envejecimiento fisiológico más que cronológico ya que sometiendo a moscas jóvenes a estrés oxidativo (mediante aplicación de peróxido de hidrógeno) consiguieron reproducir patrones de sueño asociados a envejecimiento (Kho et al., 2006).

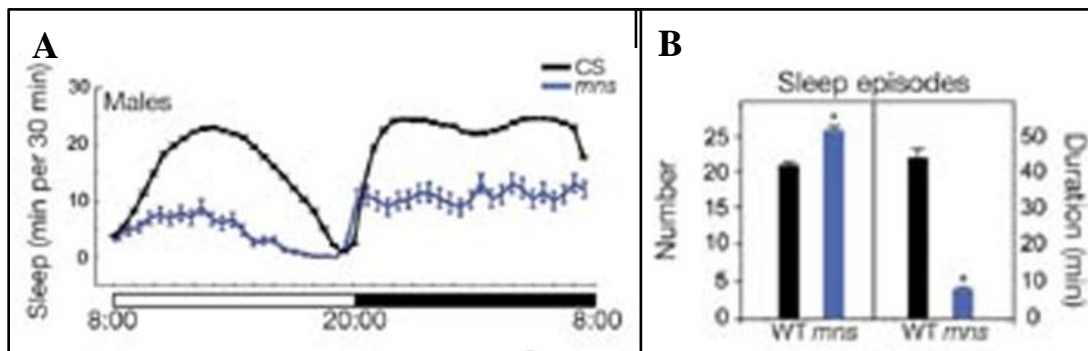


Figura 8. Sueño en mutantes *Sh* (*miniesleep*, *mns*). *A.* Sueño a lo largo del día (intervalos cada 30 min.) en moscas salvajes (*CS*) y mutantes *mns*. La barra blanca y negra indican los periodos de luz y oscuridad respectivamente. *B.* Duración (en min.) y número de episodios de sueño registrados en moscas *CS* y *mns*. Modificado de (Cirelli et al., 2005).

En *Drosophila*, diferentes estudios apuntan hacia los *mushroom bodies*, la estructura encargada del aprendizaje y memoria, como principal implicado en el control del sueño (Harbison et al., 2009). Se propone que esta estructura podría, además de promover el sueño, inhibirlo mediante diferentes grupos neuronales. Sin embargo, al eliminar químicamente esta estructura se reduce el sueño, pero no lo anula, de manera que deben existir otras regiones dentro del cerebro de mosca implicadas en el control del sueño (Harbison et al., 2009).

En general, se pueden clasificar en cuatro grandes grupos a los genes cuyas mutaciones producen anomalías del patrón de sueño en *Drosophila*:

Canales iónicos

Mediante screenings genéticos se han identificado mutaciones en canales iónicos con un impactante efecto en el sueño en *Drosophila*.

Shaker (*Sh*), codifica para una subunidad α de un canal de potasio responsable de la corriente I_A de inactivación rápida. Mutantes de pérdida de función de este gen muestran una fuerte reducción del sueño (2 a 4 horas diarias) debida principalmente a una fuerte reducción de la duración de los episodios (Figura 8). Sin embargo estos mutantes no muestran hiperactividad (actividad/minuto) y la regulación circadiana y

homeostática no están alteradas (Cirelli et al., 2005). Mutaciones en genes que codifican para proteínas que modulan de manera directa o indirecta la corriente I_A tienen un efecto similar en sueño. Mutaciones en *Hyperkinetic*, (codifica para una subunidad β moduladora que interactúa con Shaker) y *sleepless* (codifica para una proteína de membrana anclada a glicosilfosfatidilinositol, sin función conocida, pero cuyo alelo *quiver*, reduce los niveles de *shaker*) también resultan en fenotipo de reducción de sueño, aunque los mutantes *sleepless* además no mantienen la regulación homeostática (Cirelli, 2009).

Genes implicados en regulación circadiana

El reloj central proporciona información sobre los tiempos de descanso y actividad (Shaw et al., 2000; Hendricks et al., 2003). Pero, además existen estudios que sugieren que, mutaciones en determinados genes circadianos afectan también en cierto grado a la regulación homeostática (Harbison et al., 2009). Mutantes nulos para *timless* pierden la respuesta a privación de sueño sugiriendo la posibilidad de que tenga un papel en la regulación homeostática (Hendricks et al., 2000). Sin embargo, Parisky et al. (Parisky et al., 2008) propusieron a las neuronas LNvs y a PDF como el nexo que une ambos procesos de regulación de sueño, circadiano y homeostático. Resultados de estudios independientes llevan a esta conclusión. Por un lado, estimular a las neuronas LNvs resulta en una disminución del sueño, mientras que la actividad correlaciona directamente con el número de neuronas LNvs excitadas (Shang et al., 2008). Del mismo modo, mutantes nulos para *pdf* o para sus receptores muestran un incremento del sueño. Por otro lado, las neuronas LNvs expresan *Rdl* (*Resistant to dieldrin*) que codifica para el receptor GABA-A, (promotor del sueño en mamíferos), lo que sugiere que las neuronas PDF forman parte del circuito de sueño (Harbison et al., 2009).

Neurotransmisores y neuromoduladores

Existen numerosas evidencias que indican que neuromoduladores, como la serotonina, octopamina y dopamina, son importantes reguladores de la actividad en

invertebrados (Kume et al., 2005). Pero, además de su relación directa con la actividad, también se ha descrito, al igual que en mamíferos, su implicación en los ciclos de sueño-actividad.

Tal y como se comenta en el apartado 2, la DA, así como genes implicados en señalización dopaminérgica, afectan a la cantidad de sueño de las moscas, mediante una relación inversa según la cual incrementar dopamina resulta en una disminución del sueño y viceversa (Van Swinderen and Andretic, 2011).

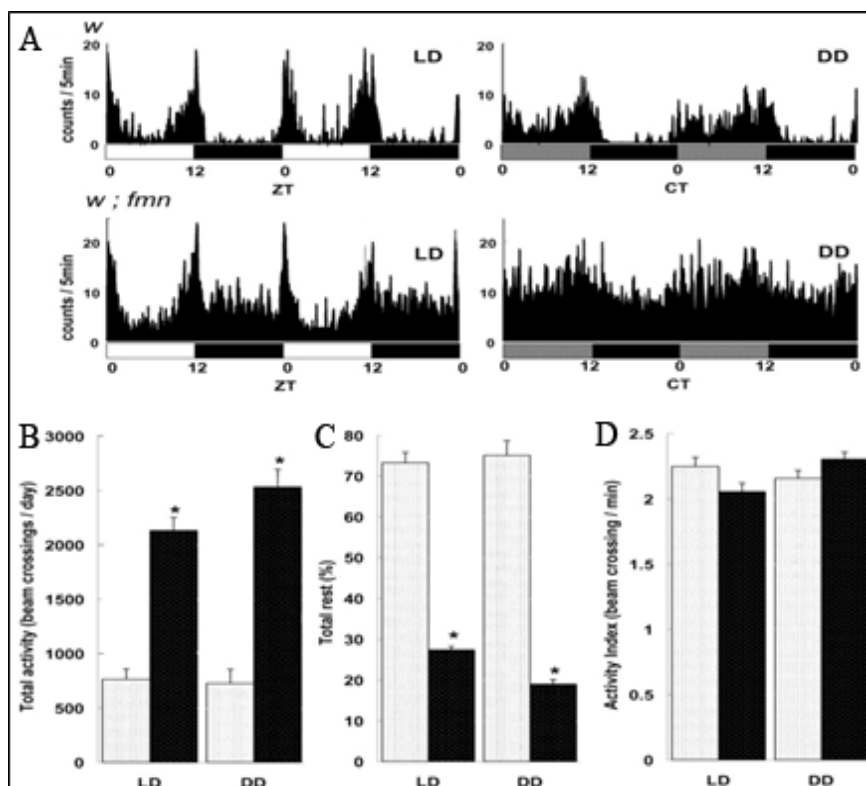


Figura 9. Los mutantes *fmn* presentan elevados niveles de actividad total, aunque sin incremento de la actividad por minuto, y reducidos niveles de sueño. **A.** Media de actividad durante dos días para individuos control (*w*, gris) y *w;fmn* (negro) ($n=10$ en ambos casos) en condiciones de LD y DD. **B.** Actividad diaria total. **C.** Media del sueño diario total. **D.** Índice de actividad. Modificado de (Kume et al. 2005)

Los mutantes *fumin* (*fmn*) tienen un comportamiento hiperactivo causado por una mutación en el gen que codifica para el transportador de dopamina (DAT), resultando en un incremento de dopamina en el terminal sináptico. La eliminación de DAT genera un dramático incremento en la duración de la fase activa con una correspondiente reducción del sueño, tanto en condiciones de luz-oscuridad como en ausencia de estímulo ambiental (Figura 9), que además se vuelve fragmentado (Kume et al., 2005).

4. ACTIVIDAD

La locomoción es el resultado de una respuesta originada por la interacción del sistema nervioso central (generador central de los ritmos que dirigen la locomoción), los músculos y el conjunto de motoneuronas y neuronas sensoriales que establecen un feedback con el sistema nervioso central que ajusta el movimiento (Hughes and Thomas, 2007). La larva de tercer estadio (Larva III) de *Drosophila* es un modelo muy eficaz para estudiar la locomoción puesto que, los parámetros asociados a actividad, tanto a nivel de la unión neuromuscular (NMJ), como a nivel comportamental, están ampliamente descritos y definidos en este sistema.

4.1. UNIÓN NEUROMUSCULAR LARVARIA

Los músculos de la pared de la larva descansan sobre la superficie interna del cuerpo, justo por debajo de la epidermis y la cutícula, formando una capa interna que rodea las vísceras. Cada músculo está compuesto por una única fibra multinucleada (Peron et al., 2009). En cada hemisegmento de la larva hay 30 músculos, unos dispuestos longitudinalmente y otros, transversales y perpendiculares al eje corporal. En los segmentos abdominales (2-7) los músculos presentan un patrón ordenado e idéntico, mientras que el primer y último segmento son modificaciones debidas a la presencia de la boca y el final del tracto digestivo (Figura 10 A y B) (Gramates and Budnik, 1999). Los músculos de cada hemisegmento están inervados por aproximadamente 30 motoneuronas. A diferencia de las terminaciones de

vertebrados, en *Drosophila*, cada fibra muscular puede estar inervada por distintas motoneuronas cuyas terminaciones en el músculo están formadas por una serie de engrosamientos conocidos como botones sinápticos (Figura 10 C) (Johansen et al., 1989).

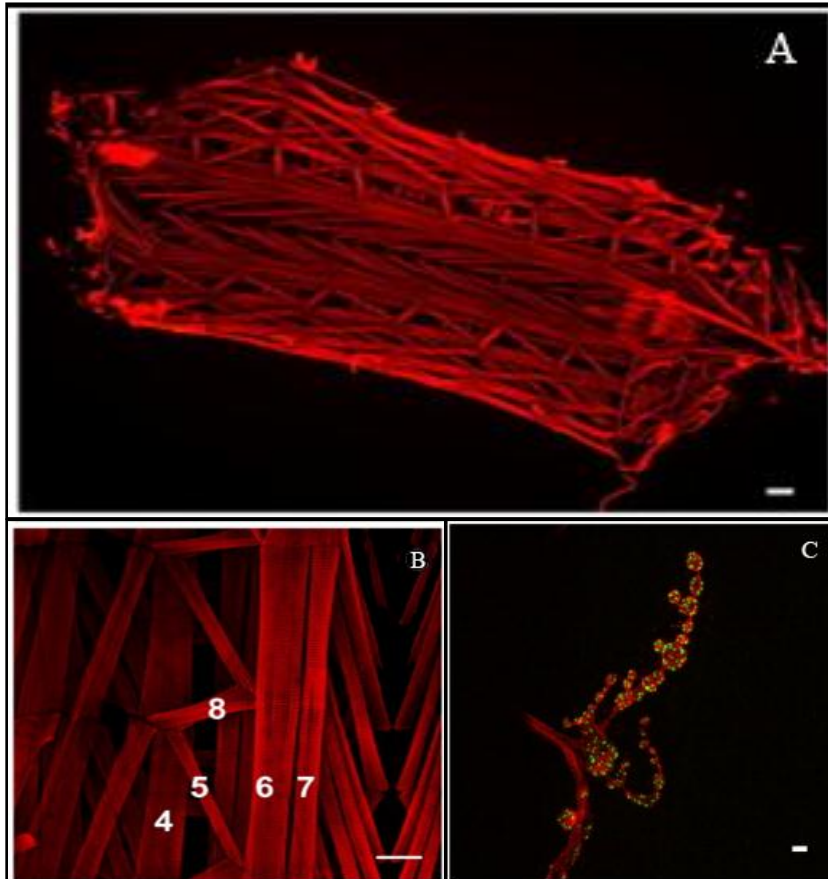


Figura 10. Organización general de los músculos y la terminación neuromuscular larvaria de *Drosophila*. A. Músculos de larva III teñidos con rodamina-faloidina. Barra de calibración, 200 μ m. B. Detalle del patrón muscular típico presente en cada segmento (los músculos son identificados por número). Barra de calibración, 100 μ m. C. Terminal de la motoneurona sobre los músculos longitudinales 6 y 7 marcado con anti-HRP (rojo). En verde, marcado con anti-Bruchpilot se muestran los sitios activos presinápticos. Barra de calibración, 1 μ m. Modificado de (Peron et al., 2009)

En *Drosophila* existen tres tipos de botones sinápticos que se clasifican como botones de tipo I, II y III y que se distinguen a nivel morfológico. Los botones tipo I

contienen vesículas de glutamato y tienen un tamaño de entre 2-6 μ m y pueden subdividirse en botones tipo I grandes (3-6 μ m) y botones tipo I pequeños (2-4 μ m). Los botones tipo II contienen vesículas de glutamato y octopamina y tienen un tamaño menor (1-2 μ m). Los botones tipo III están presentes solo en los axones que inervan el músculo 12 y contienen vesículas de un péptido tipo insulina (Peron et al., 2009).

Los axones desde los que se originan los botones tipo I y II muestran un patrón de inervación diferente. Así, cada axón tipo I normalmente inerva uno o dos músculos, sugiriendo un papel en el control fino de la contracción, mientras que los terminales tipo II inervan la mayoría de músculos de un segmento, probablemente modulando la contracción de una manera más general (Gramates & Budnik, 1999).

Dentro de cada botón existen múltiples zonas de liberación de neurotransmisor, llamados sitios activos, donde las vesículas son agrupadas y fusionadas. Enfrentados a cada zona activa, se agrupan receptores de glutamato en la membrana post-sináptica. Las zonas activas presinápticas pueden ser visualizadas mediante la inmunodetección de Bruchpilot (BRP) (Figura 10 C) una proteína homóloga a ELKS (glutamine, leucine, lysine, and serine-rich protein), constituyente de zonas activas en vertebrados. BRP actúa controlando la localización de las barras T y canales de Ca²⁺ en las zonas activas por lo que está implicado en la regulación de la fuerza sináptica (Collins and DiAntonio, 2007).

4.1.1. FISIOLÓGÍA DE LA NMJ LARVARIA

La contracción de los músculos en la larva no está acoplada a potenciales de acción del músculo, sino a potenciales postsinápticos que son graduados en amplitud y duración, dependiendo de la cantidad de neurotransmisor liberado y el tiempo que permanece en el terminal sináptico. De hecho, no hay canales de Na⁺ dependientes de voltaje en el músculo larvario, de manera que la despolarización y la contracción implican canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje.

Existen dos tipos de corriente de Ca^{2+} y cuatro de K^+ en el músculo de larva. Las dos corrientes de Ca^{2+} son similares a las corrientes tipo L y T de Ca^{2+} en vertebrados. De las corrientes de K^+ , IA es una corriente de rápida activación que se inactiva durante despolarizaciones sostenidas, mientras que IK es una corriente de activación lenta con poca inactivación (HODGKIN and HUXLEY, 1952). Las otras dos corrientes de K^+ (ICF y ICS) son dependientes de Ca^{2+} (Peron et al., 2009).

Mediante ensayos de electrofisiología se ha descrito que en el músculo larvario, la resistencia de membrana específica (R_m) es de entre 2 y 6 $\text{k}\Omega/\text{cm}^2$, la capacitancia de membrana (C_m) de aproximadamente 7 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ y el potencial de reposo, regulado por conductancia pasiva de Na^+ y K^+ , es de -60mV, (Jan and Jan, 1976; Stewart et al., 1994).

La mayoría de los experimentos en la NMJ de larva se han realizado en los músculos longitudinales 6 y 7 (Figura 10) que son eléctricamente isopotenciales, facilitando el registro de potenciales miniatura (mEJPs) y potenciales evocados (EJPs). Los mEJPs están causados por la liberación espontánea de una única vesícula de neurotransmisor desde el terminal sináptico, por lo que representa la despolarización mínima del potencial post-sináptico (aproximadamente 0,8mV). La amplitud de los potenciales evocados en un suero salino fisiológico (concentración externa de Ca^{2+} 1,8 mM) es de aproximadamente 20-25 mV. Los potenciales evocados y la frecuencia de liberación espontánea son dependientes de Ca^{2+} externo, el cual, del mismo modo que en vertebrados, dispara el mecanismo responsable de la liberación de vesículas en el terminal sináptico (Peron et al., 2009).

Además, en los registros de los músculos de larva es posible observar fenómenos de facilitación (incremento de respuesta frente a un estímulo tras estimulación previa) y/o depresión sináptica (menor respuesta a un estímulo tras estimulación previa) (Featherstone and Broadie, 2000; Rohrbough et al., 2000).

4.1.2. IMPLICACIONES DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA EN EL DESARROLLO DE LA NMJ LARVARIA.

La formación de sinapsis requiere señalización bidireccional entre las células pre y post-sináptica que dirijan el desarrollo de estructuras especializadas en liberación y detección de neurotransmisor. Mientras que los mecanismos básicos de la formación de sinapsis están probablemente determinados de manera genética, la maduración y la estabilidad son dinámicamente reguladas durante el desarrollo (Collins and DiAntonio, 2007).

Al igual que en mamíferos, en *Drosophila*, ni el establecimiento de la sinapsis con la diana ni el proceso de navegación axonal parece ser dependientes de actividad eléctrica (Goodman and Shatz, 1993). Sin embargo, sí se ha demostrado la implicación de dicha actividad eléctrica en el remodelamiento de las conexiones (Budnik, 1996).

Mutaciones que alteran la excitabilidad neuronal afectan a la morfología de la terminación neuromuscular (Figura 11). Los efectos descritos para mutantes en canales de K^+ dependientes de voltaje (*Sh*, *eag*), que generan fenotipos de hiperexcitabilidad muestran un incremento del número de varicosidades en la NMJ larvaria así como un aumento del número de botones. Por el contrario, disminuir la densidad de canales de Na^+ (mutantes *nap*) o bloquear éstos mediante tetradotoxina (TTX) resulta en un fenotipo de hipoexcitabilidad asociado a una disminución de las ramificaciones y del tamaño de los botones sinápticos (Lnenicka et al., 2003). En ambos contextos, los fenotipos observados se rescatan mediante la combinación de mutantes hiper e hipoexcitables (*eag*^{4pm} *Sh*^{rk0120} *nap*^{ts} y *nap*^{ts}; *Db para*⁺, respectivamente) (Figura 11) (Budnik et al., 1990; Lnenicka et al., 2003).

Todos estos cambios implican además defectos funcionales. Se ha descrito que el tamaño de los botones correlaciona con el número de mitocondrias y vesículas activas que contienen (Lnenicka et al., 1986). Por otro lado, mutaciones en los canales de K^+ , no solo incrementan la excitabilidad neuronal, sino que también incrementan la liberación de neurotransmisor (Ganetzky and Wu, 1983) debido al lento decaimiento del potencial de acción. La consecuencia, descrita para mutantes

Sh, es una mayor despolarización de la membrana de la célula muscular (Ueda and Wu, 2006).

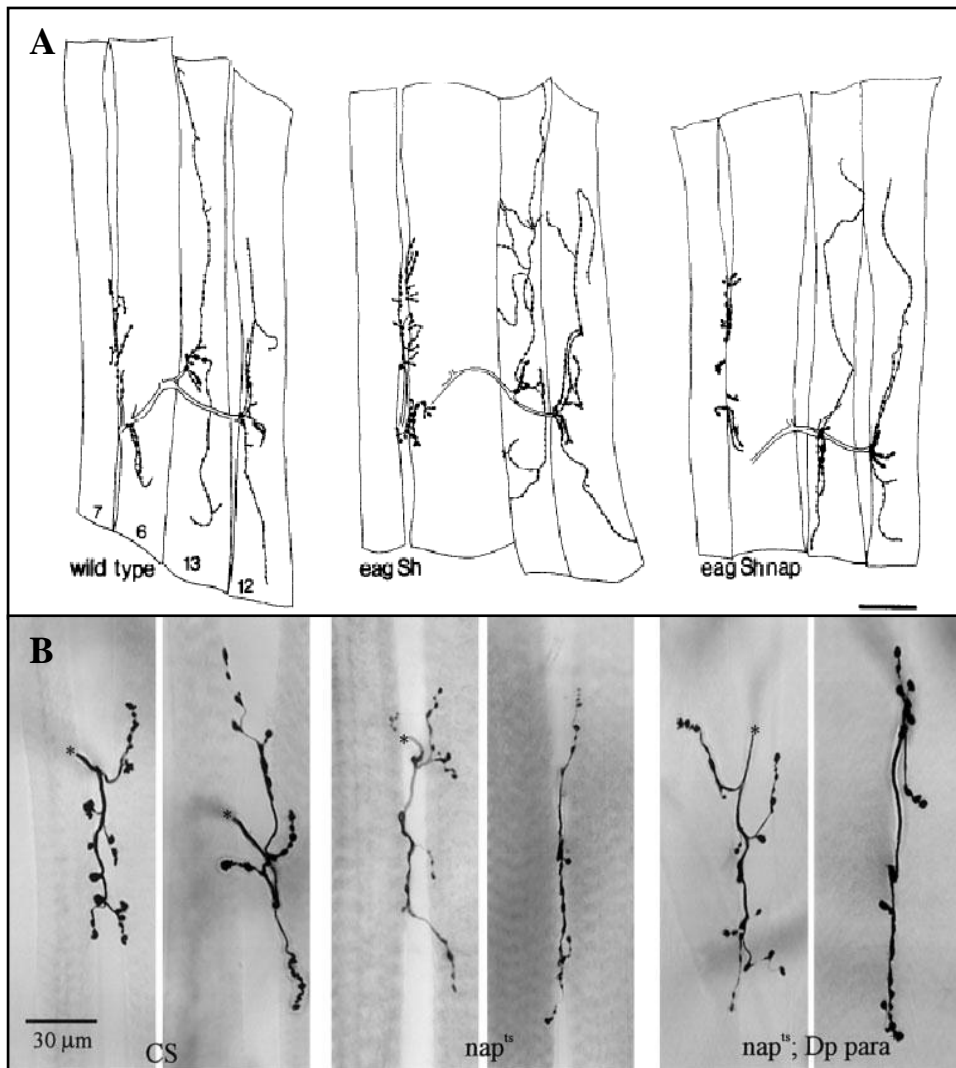


Figura 11. Morfología de la NMJ larvaria en mutantes de excitabilidad. A. Esquema mostrando los terminales axónicos de los músculos 6,7,12 y 13 de individuos wt, mutantes *eag Sh* y *eag Sh nap*. El incremento de ramificaciones del doble mutante (*eag Sh*) es suprimido por *nap*. Barra de escala, 50 μ m. Modificado de (Budnik et al., 1990). **B.** Terminales larvarios representativos de CS, *nap^{ts}* y *nap^{ts}; Dp para⁺*. El tamaño de los botones sinápticos en mutantes *nap^{ts}* fue significativamente menor que en CS o *nap^{ts}; Dp para⁺* (Lnenicka et al., 2002).

4.2. MOVILIDAD EN LARVA III

La locomoción de la larva III de *Drosophila*, en su estadio errante, es un comportamiento estereotipado consistente en movimientos rectos alternados con paradas asociadas a cambios de dirección o toma de decisiones (Wang et al., 1997). La detallada descripción de los patrones de movilidad en este estadio, convierten este sistema en una herramienta muy eficaz para estudiar las consecuencias comportamentales derivadas de los defectos morfológicos y electrofisiológicos encontrados en mutantes de excitabilidad.

Uno de los parámetros más afectados en la locomoción de larva III en estos mutantes, es la trayectoria. Mutantes *paralytic^{ts1}* (mutantes para el canal de Na⁺ dependiente de voltaje), muestran un incremento del número de cambios de dirección así como una disminución de la velocidad media, mientras que mutantes *Sh* o *Hk* tienen preferentemente trayectorias rectas y un incremento de la velocidad (Wang et al., 1997, 2002).

Un estudio detallado del movimiento peristáltico revela que, el tamaño de la zancada (avance de la larva tras un ciclo de contracción/relajación muscular) en mutantes hiperactivos *eag¹ Sh¹²⁰* es menor, mientras que la frecuencia de los ciclos de contracción muscular, es mayor. Sin embargo, el análisis de contracciones individuales en estos mutantes reveló que éstas pueden ser tan largas como las realizadas por individuos control, de manera que, no sólo la frecuencia y fuerza de la contracción, sino la coordinación entre los diferentes segmentos, parecen determinantes del correcto patrón peristáltico. En la combinación triple mutante *eag¹ Sh¹²⁰; nap^{ts1}* se restauran estos parámetros, acercándose a valores similares a los mostrados por individuos control (Wang et al., 2002).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEAS DE MOSCAS UTILIZADAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para la generación de mutantes nulos *Dmlh*, mediante recombinación basada en FRT-FLP, utilizamos las líneas *ywFLP;lh⁰¹⁵⁹⁹/SM6a* y *w;lh⁰¹⁴⁸⁵/CyO* (Bloomington Stock Centre), con inserción de un elemento PiggyBac y la línea *ywFLP;Noc^{SCO}/SM6a* que expresa una flipasa para promover la recombinación (Exelisis). Las moscas control utilizadas corresponden a moscas isogenizadas con los mutantes nulos *Dmlh* obtenidos.

LINEAS Gal-4

Utilizamos tres líneas Gal-4 en este trabajo. D42G4, que dirige la expresión a motoneuronas (Yeh, et al., 1995), 24BG4, una inserción viable en el locus de *held out wings* (Brand and Perrimon, 1993) que dirige la expresión a músculo (Fyrberg et al., 1997) y THG4, promotor del gen *pale* que codifica para la Tiroxina Hidroxilasa, para dirigir la expresión a células dopaminérgicas.

LINEAS UAS

Para localizar la expresión de las células dopaminérgicas (TH positivas) utilizamos la línea *w;+;UAS:GFP nuclear* (Bloomington Stock Centre).

Para la realización de mutantes dirigidos para el canal Ih, utilizamos una línea generada en el laboratorio del Dr. Gisselmann (Alemania) consistente en una isoforma mutante del gen *DmIh* (UAS:Ih^{DN}).

Todas las líneas utilizadas fueron isogenizadas con respecto a la línea control de la deficiencia para *DmIh*, para facilitar la comparación entre los diferentes genotipos. Además, en este proceso, se eliminó la mutación *white* (*w*-).

Las estirpes fueron cultivadas en un medio estándar para *Drosophila*, mantenidas a 25°C en condiciones de humedad constantes y entrenadas en condiciones de luz-oscuridad (LD) o de oscuridad constantes (DD).

2. GENERACIÓN DE MUTANTES PARA *DmIh*

2.1. GENERACIÓN DE MUTANTES NULOS

Existen cuatro tipos de elementos móviles insertados en el genoma de *Drosophila* (Elementos P y tres tipos de elementos tipo PiggyBac). Los elementos móviles insertados en el gen *DmIh* de *Drosophila* son del tipo PiggyBac (pBac) (Figura 12).

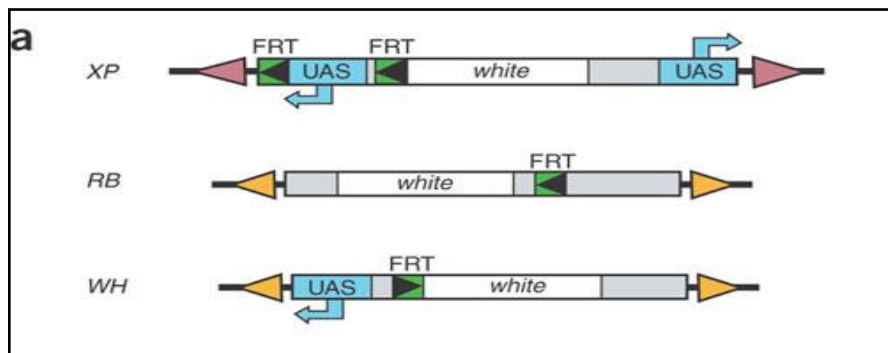


Figura 12. Esquema de los tres tipos de transposones empleados para generar deleciones basadas en FLP-FRT. Se indican los sitios FRT, y las secuencias conteniendo UAS y gen *white* (Parks y col. 2004)

Con frecuencia este tipo de elementos móviles saltan sin generar deleción en el gen en que se encuentran insertados, lo que imposibilita la generación de mutantes de

falta de función mediante este procedimiento. Por este motivo empleamos la técnica de Flip-out consistente en generar deleciones en un determinado gen por recombinación basada en FRT-FLP (Figura 13A).

En la figura 13B se muestra la localización de los diferentes elementos P insertados en el gen *DmIh*. Para llevar a cabo esta técnica utilizamos el elemento PBacRB⁰¹⁵⁹⁹, insertado delante del exón 4 y el elemento PBacWH⁰¹⁴⁸⁵ insertado detrás del exón 12. La activación de una flipasa mediante choque térmico, promueve la recombinación entre ambos elementos piggyBac, generando una deleción de la región genómica situada entre ellos y un elemento piggyBac completo resultante de la unión de los extremos 3' de cada pBac original (Figure 13A).

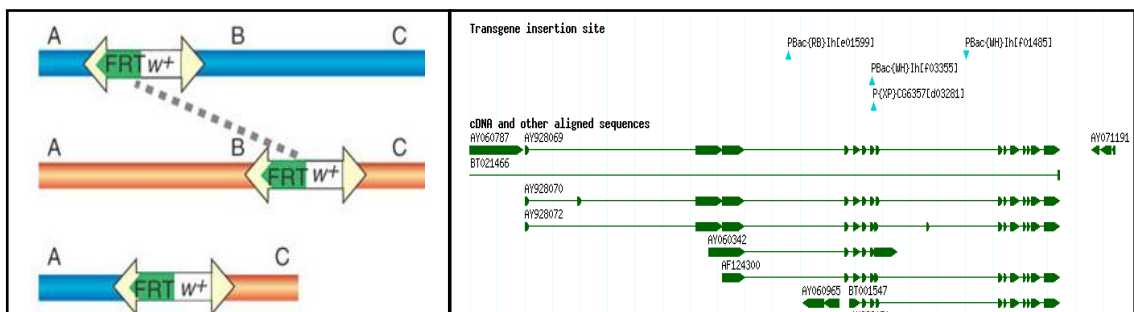


Figura 13. Recombinación basada en FRT-FLP. A. Esquema de la generación de deficiencia por Flip-out (Parks y col. 2004) B. Secuencia del gen *Ih* mostrando inserciones de elementos P (Flybase.bio.indiana.edu/).

Es necesario generar del orden de 50 líneas para obtener al menos un mutante (Parks et al., 2004).

2.1.1. VALIDACIÓN: PCR

El DNA genómico de las diferentes líneas obtenidas fue extraído mediante “High pure PCR template preparation Kit” (Roche) y, validado por PCR.

Realizamos una primera PCR utilizando cebadores de la región susceptible de ser delecionada (amplicon 242 pb), con el fin de descartar candidatos. Aquellas líneas que mostraron un resultado negativo fueron candidatas para una segunda PCR de validación con cebadores que reconocen los extremos 3' de ambos elementos pBac

que quedan fusionados en caso de delección. El amplicón generado es de 7,5 Kb por lo que la PCR se realizó utilizando la Taq long extend Roche (3,75U).

CEBADORES			
Secuencia amplificada	Secuencia cebador	Tm	Amplicón
Ih directo	AACGATGATCTGAGCACACG	57°C	242 pb
Ih reverso	CAGCGTTGTCTTGTTCATAA	56°C	
pBac 3´directo	TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA	59°C	7,5 Kb
pBac 3´reverso	TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA	59°C	

2.2. GENERACIÓN DE MUTANTES DIRIGIDOS. RNA INTERFERENTE

Dos grupos han descrito que el RNAi formado por un híbrido de cDNA-Genómico supone una estrategia muy efectiva para bloquear la función de un gen en organismos vivos (Smith et al., 2000; Kalidas and Smith, 2002).

Para la generación de un RNAi para *DmIh* se fusionaron el DNA genómico, que contiene los exones 9-15 (recogen todas las isoformas del gen) con su correspondiente fragmento de cDNA invertido. Ambos fragmentos fueron amplificados con primers específicos conteniendo sitios únicos de restricción y subclonados en un vector pBluescript II KS (+), desde donde se secuenció la construcción a partir de los orígenes M13 y M13r.

La construcción completa fue después subclonada en un vector pUAS_t (Brand and Perrimon, 1993), lo que permitirá dirigir su expresión bajo el control de Gal4. El RNAi fue inyectado en embriones yw por técnicas de transformación estándar (BestGene inc CA USA)

CEBADORES			
Secuencia amplificada	Secuencia cebador	Tm	Amplicón
Ih genómico directo	GGCGTGAATTCGATGACGTGTCGTTGTACG G (EcoRI)	72°C	948 pb
Ih genómico reverso	TAAAATATGCGGCCGCTTAGTCGCACCAGG GATAACAG (Not I)	72°C	
Ih cDNA directo	CCCCTCGAGTTGATGACGTGTCGTTGTACGG (XhoI)	72°C	693 pb
Ih cDNA reverso	TAAAATATGCGGCCGCTTAGTCGCACCAGG GATAACAG (Not I)	73°C	

3. LOCALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *DmIh*

Existen dos anticuerpos comerciales para Ih que funcionan en mamíferos (Abcam). Sin embargo, no existe ningún indicio de su funcionamiento en *Drosophila*. Además, el grupo de Gisselmann desarrolló un anticuerpo adicional contra la región peptidérgica del canal Ih correspondiente a los aminoácidos 407-420 de *P.argus* que reconoce el canal en *Drosophila* (Gisselmann et al., 2005). Sin embargo, en nuestro laboratorio no hemos conseguido obtener ningún resultado de la realización de inmunodetección con ninguno de ellos.

3.1. HIBRIDACION “*IN SITU*” DE RNA

En un intento de localizar la expresión, realizamos hibridaciones *in situ* de RNA en diferentes tejidos de larva III y adulto. No obtuvimos resultados en adulto; ni en disecciones de cerebro, ni en secciones de parafina o criostato. Tampoco vimos expresión de *DmIh* en sistema nervioso central de Larva III. En este apartado solo desarrollamos el protocolo seguido para la única hibridación con resultado positivo, el musculo de larva III.

La sonda para *Dmlh* fue obtenida a partir del clon CG23838, correspondiente al vector pOT2 con una inserción de 2828 pares de bases de cDNA, que fue utilizado con éxito en el laboratorio de Perrin (Monier et al., 2005). Las sondas *sense* y *antisense* fueron marcadas con digoxigenina, e hibridadas a 60°C, en larvas III diseccionadas en libro y permeabilizadas con proteinasa K ((25µg/ml, 2 minutos). Tras una incubación con anti-digoxigenina acoplada a fosfatasa alcalina (1:1000) se reveló mediante NBT/BCIP (Roche). Las imágenes se tomaron con un microscopio Leica Wild MPS52.

3.2. ESTUDIO DE LA EXPRESION DE Ih EN CELULAS DOPAMINERGICAS

3.2.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS: FLOURESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS)

La “clasificación celular activada por fluorescencia” es un tipo de citometría de flujo especializada, que proporciona un método para separar células de una muestra heterogénea en dos o más viales, basándose en las características de fluorescencia y dispersión de la luz de cada una de ellas.

El disgregado celular se realiza a partir de cerebros diseccionados de individuos THG4/UAS:GFP. Puesto que las células dopaminérgicas representan aproximadamente el 0,1% del cerebro (aproximadamente 150 células), realizamos disecciones del mayor número de cerebros posibles (55) en frío y en un tiempo máximo de una hora para evitar que las células mueran. Además realizamos una disección adicional de 10 cerebros control (sin fluorescencia) que serán utilizados para establecer el umbral en el FACS.

Siguiendo el protocolo descrito por Bainton (2000), disgregamos las células con la ayuda de agujas tras incubar los cerebros con tripsina durante 40 minutos a 28°C. Las células son incluidas en suero fetal (FCS 1%), medio en el que se procedió a la realización del FACS llevado a cabo por el Servicio de Citometría del CBM.

3.2.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE *Ih* EN LAS CÉLULAS TH AISLADAS

Se extrajo el RNA de, aproximadamente 200 de las células recogidas (tanto GFP positivas, como negativas), mediante “RNAspin” (GE Healthcare). Del mismo modo y, para una cantidad equivalente de células, se extrajo RNA de individuos mutantes nulos para *DmIh* como control negativo.

La retrotranscripción y posterior PCR se llevo a cabo en un único paso, con el kit RT-PCR (GE Healthcare) utilizando cebadores random para sintetizar cDNA y cebadores específicos para *DmIh* y la isoforma neural de *pale* (*ple*) para la amplificación.

CEBADORES			
Secuencia amplificada	Secuencia cebador	Tm	Amplición
<i>Ih</i> directo	AACGATGATCTGAGCACACG	57°C	112 pb
<i>Ih</i> reverso	CAGCGTTGTCTTGTTCATAA	56°C	
<i>ple-N</i> directo	CGCAGCAAGGCAAATGAT	60°C	133pb
<i>ple-N</i> reverso	AGGAGATGCCCTCCTTGAG	59°C	

4. ENSAYO DE LONGEVIDAD

Se recogieron machos control y mutantes nulos para *DmIh*, 24 horas después de la eclosión y se colocaron en tubos, en grupos de 25 individuos, a 25°C en condiciones de LD. Los individuos fueron transferidos cada 2-3 días a viales nuevos. El número de individuos muertos fue registrado diariamente. Los datos se analizaron mediante pruebas de supervivencia en SPSS13 (SPSS, Chicago, IL, USA).

5. ENSAYO DE ESTRÉS OXIDATIVO

Se colocaron machos control y mutantes nulos *DmIh* en viales con filtros conteniendo una solución de 10% de sacarosa y 1% H₂O₂ durante las primeras 24 horas, a partir de las cuales el porcentaje de H₂O₂ se incrementó al 5%. El número

de individuos muertos se cuantificó cada 8 horas. Los datos se analizaron mediante pruebas de supervivencia en SPSS13 (SPSS, Chicago, IL, USA).

6. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE DOPAMINA

6.1. EXTRACCIÓN DE DOPAMINA

6.1.1. CABEZAS DE INDIVIDUOS ADULTOS

La extracción de dopamina en cabezas de individuos control y mutantes *Dmlh* se realiza a diferentes tiempos a lo largo del día, indicados como ZT en LD y CT en DD, con el fin de estudiar la existencia de una posible oscilación.

Para cada genotipo y para cada ZT/CT analizado (0,3,7,11,15,19 y 23), se realizaron extracciones por duplicado de 10 cabezas de individuos de 6 a 8 días de edad, que fueron previamente entrenados, de 3 a 4 días, en condiciones de LD o DD.

Brevemente, el protocolo consiste en cortar las cabezas, que fueron posteriormente homogenizadas en 100 μ l de ácido perclórico 0,1M, donde la dopamina adquiere una conformación estable, y centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado mediante filtros de centrífuga de PVDF de 0,45 μ m (Teknokroma).

6.1.2. CEREBROS DE INDIVIDUOS ADULTOS

La extracción de dopamina en cerebros se realizó para individuos control y mutantes *Dmlh* de la misma edad y entrenados en las mismas condiciones a los descritos en el apartado anterior.

En este caso, cada extracción, corresponde a 16 cerebros diseccionados en PBS a 4°C en un tiempo máximo de 3 minutos por cerebro, con el fin de evitar la degradación de la dopamina. Posteriormente fueron homogenizados en 80 μ l de ácido perclórico 0,1M mediante sonicación y filtrados mediante filtros de centrífuga de PVDF de 0,45 μ m (Teknokroma).

6.2. CUANTIFICACIÓN DE DOPAMINA Y TRATAMIENTO DE LOS DATOS

Los niveles de dopamina fueron medidos en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI), mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de masas-masas. Los cromatogramas obtenidos permiten cuantificar niveles bajos de dopamina (500ppb) basándose en el tiempo de retención específico de la molécula y su masa molecular.

Cada muestra fue cuantificada por duplicado, de manera que cada valor obtenido para cada ZT/CT representa la media de los niveles de dopamina registrados de dos extracciones independientes con medidas duplicadas en HPLC. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante SPSS13 (SPSS, Chicago, IL, USA). Los datos fueron comparados mediante ANOVA de uno o dos factores, seguido de pruebas post hoc de Bonferroni. Las interacciones que resultaron significativas fueron posteriormente analizadas por pruebas *t de student*.

7. ENSAYOS DE LOCOMOCIÓN EN ADULTO: TRIKINETICS

Todos los ensayos de locomoción en adulto utilizados para medir parámetros de sueño/actividad o ritmicidad fueron realizados a mediante el sistema Trikinetics (Waltham, MA, USA), en condiciones de temperatura (25°C) y humedad constantes. En este sistema, los individuos son colocados en tubos de cristal de 65mm x 3,5 mm que contienen alimento en un extremo. Los datos son recogidos cada minuto con Drosophila Activity Monitoring Systems (DAMS, Trikinetics).

7.1. ESTUDIO DEL PATRON DE LOCOMOCIÓN

Este estudio se llevó a cabo en individuos control y mutantes nulos *Dmlh*, en condiciones de LD. Los datos obtenidos de Trikinetics fueron analizados mediante ClockLab. Para determinar si un individuo sigue un patrón de meseta o bimodal empleamos la transformación de Fourier (FFT) para obtener la frecuencia predominante del patrón de locomoción de los 6 días analizados (una frecuencia predominante de 0,042 ciclos/hora corresponde a un periodo predominante de 24

horas, mientras que 0,084 ciclos/hora correspondería a un periodo de 12 horas). Según FFT, un comportamiento normal en LD supone un periodo predominante de 12 horas debido al patrón rítmico bimodal, mientras que la actividad sostenida del patrón de meseta tiene un periodo predominante de 24 horas.

7.2. ESTUDIO DE LA RITMICIDAD A BAJA INTENSIDAD DE LUZ (ENSAYO DE FOTOSENSIBILIDAD)

Realizamos este ensayo en individuos control y mutantes *DmIh* con el fin de determinar si los mutantes nulos tienen problemas para detectar la luz. El procedimiento a seguir es el descrito por Hirsh et al. (2010) con algunas modificaciones. El ensayo consiste en entrenar a los individuos durante 4 días a intensidad de luz alta ($41\mu\text{W}/\text{cm}^2$), para después aplicarles un estímulo lumínico de baja intensidad ($0,95\mu\text{W}/\text{cm}^2$) desfasado 6 horas con respecto al anterior. La intensidad de la luz (LED) se graduó mediante un potenciómetro de 1K, y se comprobó que el coeficiente de variación a lo largo de la superficie del incubador donde se realizó en ensayo, no fuera mayor del 30% (Hirsh et al., 2010). Para medir la intensidad de luz se utilizó un fotómetro THORLABS (SN6021607) S120 (400-1100 nm). Los datos recogidos del sistema Trikinetics fueron analizados mediante ClockLab.

7.3. ESTUDIO DE SUEÑO/ACTIVIDAD

Los parámetros de sueño/actividad fueron analizados mediante el programa Flysiesta (Sorribes et al., 2011).

7.3.1. PAPILLA ESTÁNDAR

El ensayo se realizó en condiciones de LD para controles, mutantes nulos *DmIh*, mutantes dirigidos $D42Ih^{DN}$, y sus respectivos controles (+;D42G4;+ y +;UAS:Ih^{DN};+). Los datos obtenidos mediante Trikinetics, fueron recogidos de dos días consecutivos, correspondientes a una edad de 6-8 días para todos los individuos.

Se define “sueño” como periodo ininterrumpido de inactividad de al menos 5 minutos. El estado “despierto” se considera a todo el tiempo que no se establece como sueño y, estado “activo” corresponde a registros de más de un paso/minuto. Todos los parámetros fueron analizados para cada periodo, luz y oscuridad, de manera independiente, a partir de los datos promedio de los dos días registrados.

7.3.2. APLICACIÓN DE DROGA (3IY)

El tratamiento farmacológico con 3-iodotirosina (3IY, Sigma) fue llevado a cabo, en condiciones de LD, en controles y mutantes nulos *Dmlh*, según describieron Bainton et al. (Bainton et al., 2000). Brevemente, se administró 10mg/ml de 3IY en un medio de gelatina al 8% y sacarosa al 5%. Se colocaron individuos de 3-5 días de edad, en viales para Trikinetics (conteniendo gelatina con 3IY y la solución de gelatina sin droga, como control) y aclimatados durante un día previamente a la recogida de los datos para poder recoger el efecto de la droga.

7.4. ESTUDIO DE LA RITMICIDAD EN LD Y DD

Este ensayo se realizó en individuos control y mutantes nulos *Dmlh*. La ritmicidad fue analizada tanto en condiciones de LD como de DD.

Para ambas condiciones (LD o DD) se entrenaron durante 3-4 días a individuos de 5-8 días de edad en LD, antes de la recogida de los datos.

Los datos obtenidos de Trikinetics fueron analizados mediante ColckLab (Actimetrics, Evanston, IL) siguiendo los parámetros descritos por Yang y Sehgal (Yang and Sehgal, 2001), para clasificar individuos rítmicos (R), débilmente rítmicos (WR) o arrítmicos (A).

Los actogramas y periodogramas (τ , calculado a partir del test- χ^2) fueron obtenidos tanto para moscas individuales como para la media de individuos rítmicos y/o débilmente rítmicos.

8. INMUNODETECCION DE PDF

Individuos adultos control y mutantes *Dmlh* fueron entrenados durante 3 días en LD, antes de transferirlos a DD. Al tercer día en esta condición se diseccionaron los cerebros a CT2 y CT14. El anticuerpo primario utilizado fue anti-PDF de ratón (JH Park, University of Tennessee) y fue detectado con anti-ratón Alexa 555 (Jackson ImmunoResearch, PA, US). Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio Leica Wild MPS52 y analizadas mediante ImageJ. Se cuantificó la señal de ocho hemisferios para cada genotipo y condición.

9. ENSAYOS EN LARVA III

Todos los ensayos realizados en larva de estadio III se llevaron a cabo en individuos control, mutantes nulos *Dmlh* y mutantes dirigidos D42Ih^{DN} y 24BG4Ih^{DN}, con sus respectivos controles, D42G4, 24BG4 y UAS:Ih^{DN}. El estudio de la morfología de la unión neuromuscular (NMJ) y del movimiento de las larvas, se realizó en colaboración con Jose Manuel Barcia. Los ensayos de electrofisiología se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. De Polavieja (Instituto Cajal, CSIC).

9.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA TERMINACIÓN NEUROMUSCULAR LARVARIA

Se diseccionaron las larvas III en libro, en PBS-EGTA 5%, con el fin de evitar contracciones musculares. La inmunodetección se realizó con los anticuerpos anti-nc82 de ratón, que marca los sitios activos presinápticos (Wagh et al., 2006), y anti-HRP-Cy3, que marca las membranas neuronales. El revelado del anticuerpo anti-nc82 se realizó mediante incubación con un anticuerpo secundario Alexa 488 de ratón.

Las imágenes, de los terminaciones correspondientes a los músculos 6 y 7 del segmento abdominal A3, fueron tomadas mediante microscopia confocal (Olympus

IX70 con el software FLUOVIEW FV300 v.4.3) y analizadas mediante ImageJ a través de un *plugin* desarrollado en el laboratorio que cuantifica de forma automatizada el número de botones, su tamaño medio y el número de sitios activos.

Además, como control adicional, se analizó la medida de los músculos para asegurar que no existieran diferencias de tamaño que pudieran falsear los datos obtenidos (Lnenicka et al., 2003).

Los datos se analizaron con el programa SPSS13 (SPSS, Chicago, IL, USA) mediante pruebas *t de student*.

9.2. ESTUDIO DE LOCOMOCIÓN EN LARVA III

Todos los ensayos de locomoción en larva III fueron llevados a cabo tal como describieron (Wang et al., 2002) y fueron realizados a 25°C, mediante grabación del movimiento libre de la larva sobre una superficie de agarosa al 1%.

9.2.1. ANÁLISIS DEL MOVIMIENTO LIBRE DE LARVA III

Para analizar el movimiento libre de la larva se realizaron grabaciones de 2 minutos de duración tomando 15 imágenes/segundo, utilizando una cámara Moticam 350. De cada video se procesaron 100 segundos mediante ImageJ, mediante el *plugin* Mtrack2 que genera una matriz de coordenadas que contiene las posiciones del centroide de la larva a lo largo del tiempo. Estos datos fueron utilizados para calcular las diferentes variables utilizando Excel (Microsoft Office). Los cambios de dirección se calcularon analizando las diferencias entre dos ángulos formados por tres vectores de puntos consecutivos, y se consideró cambio de dirección cuando la diferencia fue mayor de 30°. La distancia recorrida se calculó como la suma de las distancias recorridas entre los puntos consecutivos a lo largo de los 100 segundos de grabación. La velocidad se obtuvo dividiendo la distancia total entre el tiempo en movimiento.

Los datos se analizaron con el programa SPSS13 (SPSS, Chicago, IL, USA) mediante pruebas *t de student*.

9.2.2. ANÁLISIS DEL MOVIMIENTO PERISTÁLTICO

Para analizar el movimiento peristáltico, se realizaron grabaciones durante 10 segundos en las mismas condiciones que en apartado anterior. Los videos se analizaron utilizando ImageJ, mediante un *plugin* desarrollado en el laboratorio, que realiza medidas del área y de la longitud mayor de cada larva durante el movimiento registrado. Los datos son analizados en Excel (Microsoft Office). El periodo se calculó como tiempo que transcurre entre dos extensiones de la larva. La velocidad se calculó como la distancia recorrida durante el tiempo de la grabación. El promedio de la zancada es el resultados de dividir el periodo promedio entre la velocidad. Los datos se analizaron con el programa SPSS13 (SPSS, Chicago, IL, USA) mediante pruebas *t de student*.

9.3. ELECTROFISIOLOGÍA DE LA NMJ LARVARIA.

Los ensayos de electrofisiología se llevaron a cabo en Larvas III diseccionadas en libro y deaferentadas. Los músculos registrados fueron el músculo 6 y 7 del segmento abdominal A3, que son eléctricamente isopotenciales.

9.3.1. REGISTRO DE LOS POTENCIALES POSTSINÁPTICOS EXCITATORIOS MINIATURA (EJP_m).

Se introdujo un electrodo de registro en el músculo para medir las despolarizaciones espontáneas durante un tiempo de 1 minuto. Los datos obtenidos fueron analizados en MatLab.

9.3.2. REGISTRO DE LOS POTENCIALES EVOCADOS (EJP)

Los potenciales evocados se registraron succionando el nervio que inerva a los músculos sujetos de estudio con un electrodo estimulador y un segundo electrodo, el de registro introducido en el músculo. Se realizaron estimulaciones escalonadas a 0,5 Hz. hasta obtener la despolarización máxima del músculo. Cada registro obtenido para cada intensidad de estímulo, es el resultado de la respuesta de 15 trazas con

pausas de 2 segundos entre ellas. Los parámetros de potencial de reposo celular y despolarización máxima alcanzada se analizaron mediante MatLab.

Para la forma del potencial de respuesta se calculó la anchura de la curva obtenida en el músculo tras la estimulación cuantificada por la constante de tiempo a de un ajuste exponencial a la cola del EJP obtenido.

La dinámica de la respuesta de la NMJ fue estudiada mediante un protocolo escalonado similar al seguido para registrar la los potenciales evocados, hasta alcanzar la respuesta máxima a partir de la cual se disminuye el estímulo de manera simétrica. La facilitación (respuesta aumentada a un determinado estímulo, tras la aplicación de un estímulo previo) o adaptación (tras un estímulo previo, es necesario incrementar la amplitud de un nuevo estímulo para obtener la misma respuesta), fue calculada como la diferencia de la respuesta del EJP durante las fases de incremento y decrecimiento

9.3.3. APLICACIÓN DE ZD7288

Para analizar las consecuencias de eliminar la corriente I_h , sin afectar al desarrollo, utilizamos un bloqueante específico de la corriente I_h ZD7288 (Sigma). Brevemente, el protocolo consiste en una estimulación de 50 repeticiones de 10 trazas a 0,5 Hz, con una pausa de 2 segundos entre cada una de ellas. La intensidad del estímulo aplicado fue el correspondiente al 110% del voltaje inferior capaz de producir una respuesta de amplitud máxima. Tras las primeras 10 repeticiones, se añadió ZD7288. Como control del experimento se añadió suero salino sin droga en las mismas condiciones a individuos control para asegurar que el protocolo *per se* no producía ningún efecto.

RESULTADOS

1. GENERACION Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES PARA *Ih*

1.1. GENERACION DE MUTANTES NULOS (FLIP-OUT)

En *Drosophila*, los canales HCN están codificados por un único gen que genera, al menos 12 isoformas distintas mediante *splicing* alternativo, cada una de las cuales contiene los dominios transmembrana S1 a S3 codificados por los exones 7 y 8 (www.flybase.org). Generamos un mutante nulo mediante recombinación basada en FRT-FLP, utilizando dos elementos pBac que flanquean los exones 4 y 12, con el fin de deleccionar la región genómica contenida entre ambos.

Mediante esta técnica, obtuvimos 57 líneas candidatas de haber sufrido recombinación. La validación se llevó a cabo mediante la realización de una PCR con primers de la región genómica susceptible de ser deleccionada (Figura 14). Obtuvimos una línea con resultado negativo que fue validada con una segunda PCR con primers correspondientes a los extremos 3' de ambos elementos pBac, que quedan fusionados en caso de delección. Como se observa en la figura 15 B, el DNA genómico del candidato fue amplificado obteniendo un fragmento del tamaño esperado (7,5 Kb).

Aprovechando la existencia de un único gen *Dmlh* en *Drosophila*, obtuvimos un mutante nulo por escisión del fragmento genómico que codifica para el dominio transmembrana (Exones 4-12) de la proteína.

Estos mutantes son portadores de una mutación en el gen *white* (*w*⁻) que codifica para un transportador de tipo ABC. Es habitual trabajar bajo este fondo genético puesto que es utilizado para reconocer inserciones. Sin embargo, se han descrito diferentes fenotipos asociados a esta mutación, entre ellas, variación en los niveles de neuromoduladores como dopamina (Borycz et al., 2008), así como alteraciones en determinados patrones de comportamiento. Con el fin de evitar posibles efectos de esta mutación sobre cualquiera de los parámetros analizados, realizamos una isogenización de la línea deficiente obtenida mediante cruces durante cinco generaciones con individuos wt. De esta manera, no solo eliminamos la mutación *w*⁻, sino que obtenemos un control con el mismo fondo genético que el mutante.

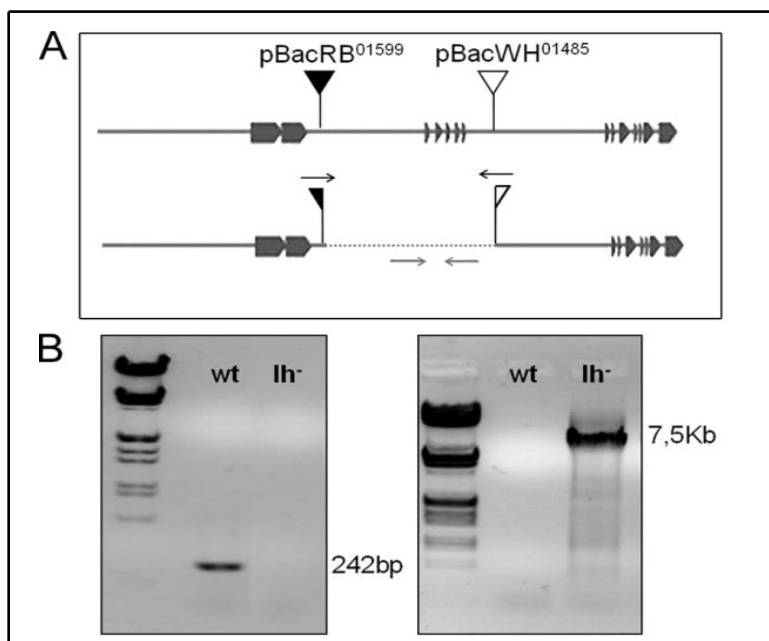


Figura 14. Validación del mutante nulo *DmIh*. A. Esquema de la región génica de *Ih* con las inserciones de los dos elementos pBac utilizados para la recombinación FRT-FLP. Las flechas gris claro corresponden a los primers utilizados para la PCR de la región genómica susceptible de delección. Las flechas gris oscuro corresponden a los primers de los extremos 3' de ambos elementos pBac, que quedan fusionados si ocurre una delección. B. Resultados obtenidos en ambas PCR. La imagen de la izquierda revela la existencia de una línea sin amplificación de la región genómica susceptible de delección (242 pb). La obtención de la línea mutante para *Ih* queda confirmada por la amplificación de un fragmento de 7,5Kb correspondiente al nuevo elemento pBac formado tras la recombinación (imagen de la derecha).

La generación de un mutante nulo nos proporciona una importante herramienta para conocer las consecuencias de eliminar la corriente Ih en un organismo completo. Sin embargo, para poder estudiar el papel de Ih en subgrupos celulares, necesitamos poder silenciar dicho gen de una manera dirigida, generando un RNA de interferencia.

A partir de la inyección del constructo generado obtuvimos 8 líneas mutantes con diferentes inserciones al azar. Expresando dicho interferente de forma ubicua (dirigido con TubulinaG4) no encontramos fenotipos visibles. Además, la falta de un anticuerpo eficaz contra Ih, ha imposibilitado la realización de la cuantificación de los niveles de proteína mediante Western Blot. Por este motivo la validación continúa en proceso de realización.

1.1.1. CARACTERIZACION DE LOS INDIVIDUOS NULOS PARA EL GEN *Dmlh*

Los individuos mutantes para el gen *Dmlh* son viables y fértiles. El estudio de longevidad muestra que no existe una reducción en la vida máxima. Sin embargo sí se muestra una reducción en la vida media de aproximadamente el 10%, haciendo más pronunciada la fase exponencial, en torno a los 35 días de edad (Figura 15A).

La reducción en la esperanza de vida, con frecuencia va asociada a envejecimiento fisiológico, que se traduce en un mayor estrés oxidativo. Sin embargo, sometiendo a los mutantes *Dmlh* a peróxido de hidrógeno la respuesta no fue significativamente distinta de la mostrada por los controles (Figura 15B). Este resultado elimina la posibilidad de que un incremento de estrés oxidativo sea la causa del aumento en la tasa de mortalidad de estos mutantes.

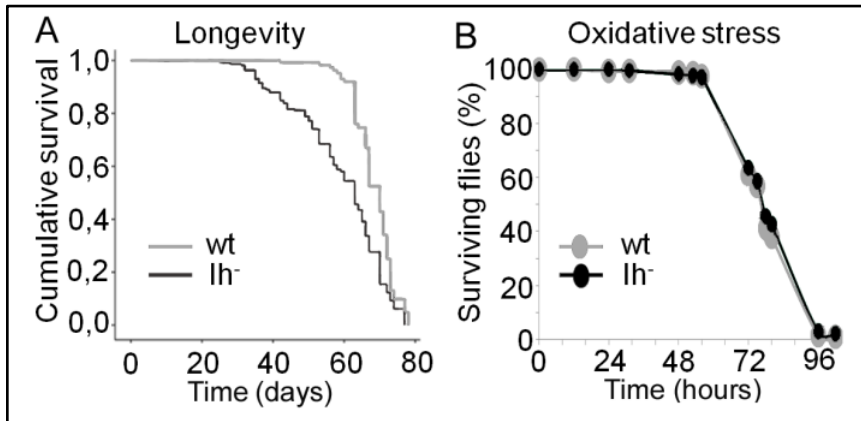


Figura 15. La ausencia de Ih acorta la esperanza de vida pero no afecta a la resistencia frente a estrés oxidativo. A. Curva de longevidad de machos mutantes *Dmlh* (línea negra, $n=234$) comparado con controles (línea gris, $n=145$). Las curvas de supervivencia entre ambos genotipos son significativamente distintas (Mantel-Cox Statistic = 32.281, $df=1$, $p < 0.0001$). **B.** La resistencia a estrés oxidativo en machos mutantes *Dmlh* (línea negra, $n=511$) no es diferente de los controles (línea gris, $n=384$)

2. ESTUDIOS DE LOS NIVELES DE DOPAMINA

2.1 LAS CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS DE *Drosophila* EXPRESAN *Dmlh*

Numerosos experimentos de electrofisiología, tanto en rodajas de cerebro de ratón (Neuhoff et al., 2002), como en disociados de neuronas (Puopolo et al., 2007) sugieren la implicación de la corriente *I_h* en la frecuencia marcapasos autónoma de las neuronas dopaminérgicas. Además, se ha descrito el papel de distintos neuromoduladores en la regulación de la excitabilidad de estas células a través de la modulación de la corriente *I_h* (Cathala and Paupardin-Tritsch, 1997, 1999; Liu et al., 2003; Arencibia-Albite et al., 2007; Vandecasteele et al., 2008).

En *Drosophila*, aunque la expresión descrita del gen *Dmlh* sugiere que es panneuronal (Marx et al., 1999), no existe la certeza de su expresión en células dopaminérgicas. Para comprobarlo, utilizamos la metodología *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) para aislar las células que expresan *pale* (TH) a partir de 55 cerebros diseccionados de individuos THG4;UAS:GFP. Obtuvimos 524.000 células no dopaminérgicas (no expresan GFP) y 623 células dopaminérgicas (células GFP positivas) con una pureza del 98.41%.

En ambos grupos celulares, encontramos expresión del gen *Dmlh* (Figura 16B), demostrando que, también en *Drosophila*, dicho gen se expresa en las células dopaminérgicas. Además, la ausencia de amplificación de la isoforma neural de *pale* en las células GFP negativas, confirma que las células fueron correctamente separadas (Figura 16B).

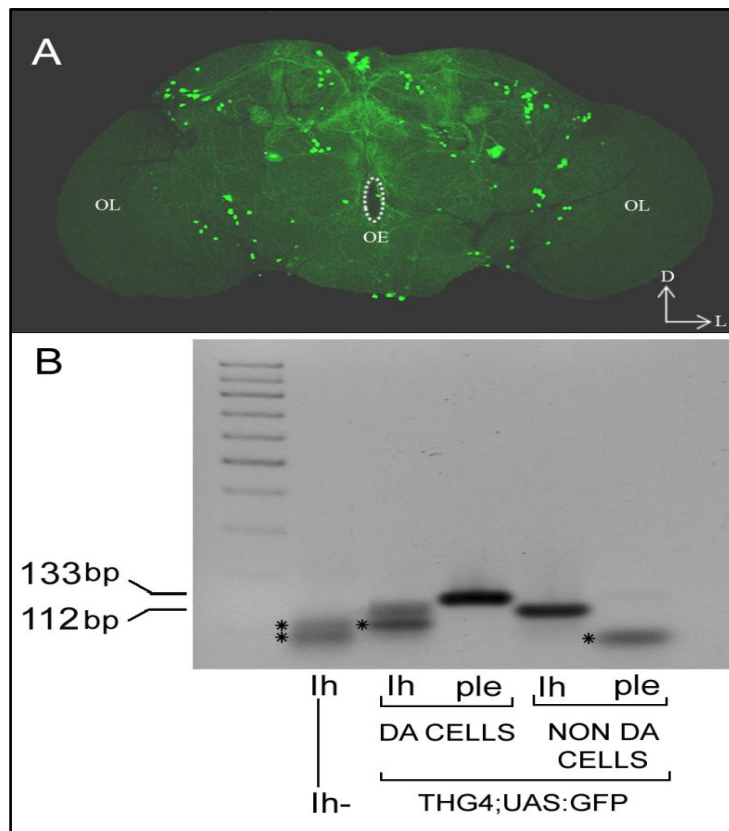


Figura 16. El gen *DmIh* se expresa en las neuronas dopaminérgicas. *A.* Proyección confocal de cerebro adulto mostrando las neuronas dopaminérgicas marcadas con GFP mediante *THGal4* (*THG4;UAS:GFP*) D, dorsal, L, lateral, OE, OL, lóbulo óptico. *B.* RT-PCR de *Ih* (112pb) y *ple* (133pb) de 200 neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas separadas mediante FACS. La imagen muestra amplificación de RNA de *DmIh* en neuronas que expresan *ple* neural (GFP positivas). Los asteriscos de los pocillos 1,2, y5 indican bandas inespecíficas obtenidas en el control negativo (extracción de RNA para *Ih* en cerebros de mutantes nulos *DmIh*-pocillo 1- y de *ple* en células GFP negativas-pocillo 5-).

2.2. LA DOPAMINA OSCILA DIARIA Y CIRCADIANAMENTE EN CABEZAS DE INDIVIDUOS CONTROL

En *Drosophila*, la oscilación del gen *pale* y del receptor de dopamina D2-like sugieren la existencia de variaciones cíclicas en los niveles de dopamina, aunque no existe ninguna evidencia directa.

Para evaluar esta posibilidad, cuantificamos dopamina en cerebros diseccionados cada cuatro horas con una medida adicional que consideramos necesaria (ZT 0), bajo condiciones de LD. A pesar de prestar especial cuidado con la integridad del tejido y el tiempo de disección (máximo 3 minutos/cerebro), no pudimos obtener resultados replicables en ningún caso, debido a la rápida degradación de la dopamina en estas condiciones.

Sin embargo, el hecho de que el 70% de la dopamina existente en la cabeza de *Drosophila* pertenece al cerebro (Boryzc et al. 2008), nos permitió realizar este experimento extrayendo la dopamina de cabezas completas.

Los resultados obtenidos por HPLC, expresados en pg/cabeza, mostraron que, los niveles de dopamina siguen un patrón rítmico en moscas control, mostrando un pico al principio y final del periodo de luz, con bajos niveles en la mitad del día (Figura 17A). Durante la noche, la dopamina mantiene los niveles bajos pero lentamente los incrementa hacia el final de la misma, hasta que la llegada de luz hace caer los niveles al mínimo para comenzar de nuevo el ciclo. La oscilación de dopamina fue confirmada mediante ANOVA de un factor, el cual mostró un efecto significativo del momento del día (ZT) sobre los niveles de dopamina. Aunque estudios previos habían sugerido una fluctuación de los niveles de dopamina en *Drosophila* (Ceriani et al., 2002; Keegan et al., 2007; Hirsh et al., 2010), nuestros datos muestran por primera vez esta oscilación.

En rata, la liberación de dopamina en el *striatum* también muestra oscilación en condiciones de LD (Castañeda et al., 2004; Hood et al., 2010), que desaparece bajo condiciones de oscuridad constante, sugiriendo que es dependiente de luz. Sin embargo, en el *nucleus accumbens*, los niveles de dopamina extracelular muestran un ritmo circadiano que continúa bajo oscuridad constante (Castañeda et al., 2004). Para descubrir si la oscilación encontrada en cabezas de *Drosophila* está influenciada por luz o bajo control circadiano, medimos los niveles de dopamina en condiciones de oscuridad constantes (DD).

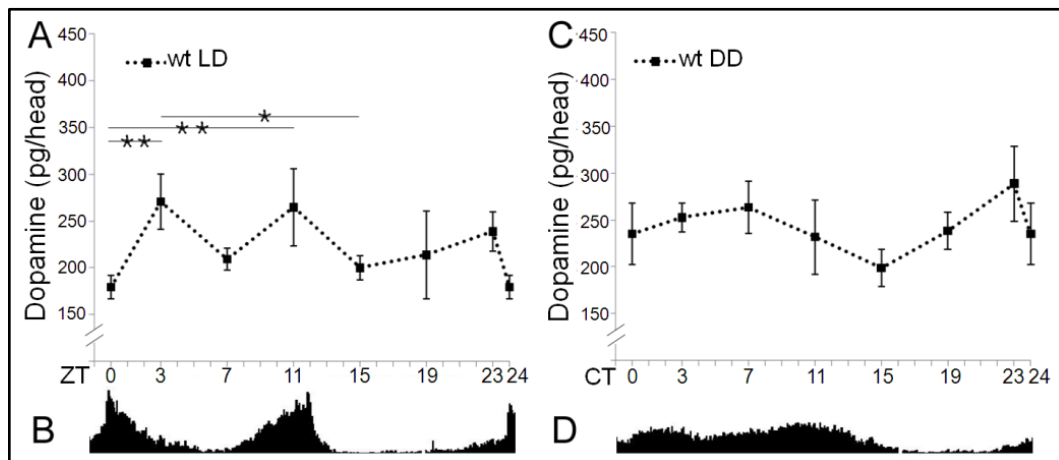


Figura 17. La dopamina oscila de manera circadiana en moscas control. Los niveles de DA y la actividad fueron analizados en moscas de 6 a 8 días de edad y al tercer o cuarto día en cada condición (LD o DD). Las barras de error indican SEM. **A.** En condiciones LD, las moscas control muestran oscilación de la cantidad de dopamina con dos picos en el periodo de luz y reducidos niveles durante la noche. Las barras de la parte superior indican diferencias significativas entre dos puntos ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, post hoc Bonferroni test). **B.** Media de la actividad total diaria ($n=32$) mostrando el patrón bimodal típico de esta condición. **C.** Bajo condiciones de DD, la oscilación de la dopamina está atenuada. **D.** Media de la actividad total diaria ($n=47$) mostrando el patrón de locomoción de meseta característico en esta condición.

Los resultados mostraron que, en condiciones de DD, la dopamina no fluctúa durante el día subjetivo (Figura 17C) manteniéndose niveles elevados. Sin embargo, decaen en la transición entre ambos periodos subjetivos para incrementarse de nuevo hacia el final de la noche subjetiva, donde se da el valor más alto. El análisis mediante ANOVA de un factor muestra un efecto del momento del día (CT) sobre los niveles de dopamina en estas condiciones, aunque las pruebas post-hoc no identificaron ningún punto significativamente distinto.

La diferencia en el patrón de oscilación de dopamina observada en LD vs DD sugiere que, también en *Drosophila*, la luz afecta a los niveles de dopamina. Para testar esta hipótesis, analizamos el efecto del tiempo circadiano (ZT o CT) y las condiciones de luz/oscuridad (LD o DD) sobre los niveles de dopamina mediante ANOVA de dos factores. Los resultados obtenidos mostraron que ambos factores, así como su

interacción, tienen un efecto significativo ($F_{13,42}=4.760$; $p<0.001$; Tabla 1 Anexo) apoyando que, los cambios en los niveles de dopamina son diferentes en LD vs DD. Sin embargo, esta diferencia parece deberse a los periodos diurnos puesto que, el análisis mediante pruebas *t de student* mostró que los únicos puntos significativamente distintos entre la condición LD o DD se encuentran durante el día ($t_6=-3.18$; $p<0.5$ para ZT/CT0 y $t_6=-3.57$; $p<0.5$ para ZT/CT7). En conjunto, estos datos corroboran que existe una regulación circadiana de los niveles de dopamina que además, pueden ser modulados por luz.

2.3 LA AUSENCIA DE CORRIENTE *I_h* AFECTA A LA OSCILACION DE DA EN PRESENCIA DE LUZ

Los resultados de HPLC en mutantes nulos *DmIh* mostraron que, en condiciones de LD, el comportamiento cíclico de la dopamina durante la fase de luz se pierde en estos individuos (Figura 18A). Sin embargo, la cantidad de dopamina media, durante la fase de luz, no fue diferente de las moscas control (230.9 ± 11.5 control y 229.5 ± 6.9 mutante; $t_{30}= 0.106$; $p=0.916$). En contraste, durante la fase de oscuridad, los mutantes nulos *DmIh* mostraron un dramático incremento de los niveles de dopamina (217.4 ± 9.3 control y 274.3 ± 12.6 mutante; $t_{22}= -3.633$; $p=0.001$). La existencia del diferente patrón de la dopamina en moscas mutantes y control fue confirmada mediante el análisis de ANOVA de dos factores, el cual mostró que tanto el genotipo, como el ZT, y la interacción entre ambos, afecta significativamente a los niveles de dopamina ($F_{13,42}=7.755$; $p<0.001$; Anexo Tabla 2). De manera que nuestros resultados sugieren la implicación de la corriente *I_h* en el mantenimiento de los niveles fisiológicos de dopamina, aunque parecen operar diferentes mecanismos en las fases de luz y oscuridad.

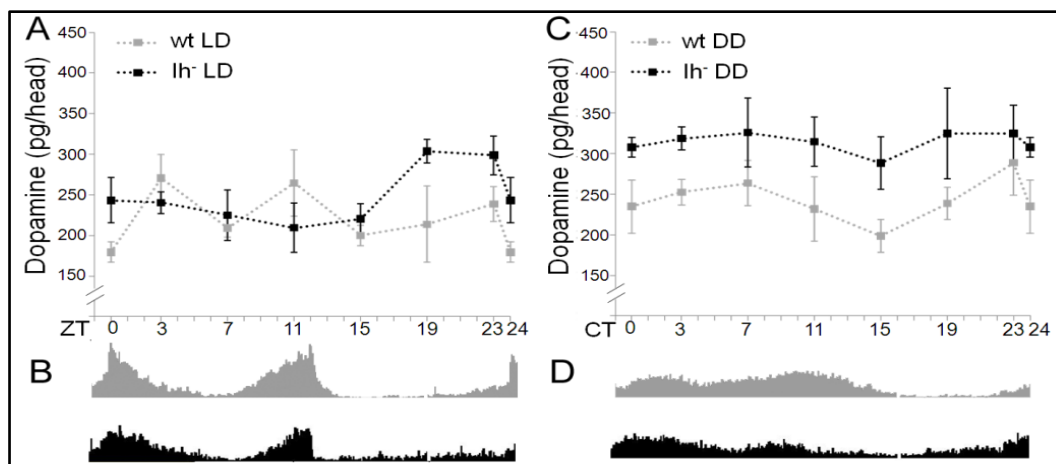


Figura 18. La falta de corriente *Ih* altera los niveles de dopamina. Los niveles de DA y la actividad fueron analizados en moscas de 6 a 8 días de edad y al tercer o cuarto día en cada condición (LD o DD). Las barras de error indican SEM. **A.** Patrón de oscilación de dopamina en moscas mutantes (línea punteada negra) vs control (línea punteada gris), en condiciones de LD. **B.** Media de actividad total diaria en moscas mutantes *DmIh* ($n=31$; actograma negro inferior) (actograma negro inferior) y moscas control (actograma gris superior). **C.** Niveles de dopamina en condiciones DD, en individuos mutantes (línea punteada negra) y control (línea punteada gris). **D.** La media de la actividad total diaria de moscas mutantes ($n=53$, actograma negro inferior) y control (actograma gris superior) en condiciones de DD.

2.4. LA AUSENCIA DE CORRIENTE *Ih* INCREMENTA LOS NIVELES DE DOPAMINA EN DD

Debido al aumento en los niveles de dopamina mostrado por los mutantes *DmIh* durante el periodo de oscuridad, nos propusimos realizar la medición de los niveles en condiciones de DD, con el fin de comprobar si el incremento observado correlaciona con la falta de señal de luz.

Los resultados mostraron que, en estas condiciones, los niveles de dopamina en mutantes para *DmIh* sufren un incremento similar al encontrado durante la fase de oscuridad en condiciones de LD (Figura 18C; 244.05 ± 7.0 para el control y 314.98 ± 6.3 para mutantes; $t_{54} = -7.529$; $p < 0.001$). El análisis mediante ANOVA de dos factores ($F_{13,42} = 6.948$; $p < 0.001$) reveló que, también en esta condición, el genotipo y CT afectan significativamente a los niveles de dopamina. Sin embargo, el

patrón circadiano no es diferente entre moscas mutantes y control, debido a que la interacción de los factores no fue significativa (Anexo Tabla 2), aunque, en los mutantes, se observa una anticipación en el incremento de los niveles de DA en la transición día-noche subjetivos.

Todos estos resultados sugieren firmemente que la corriente Ih es necesaria para prevenir una sobreproducción de dopamina en condiciones de oscuridad. Además, podemos inferir que la luz influye en la oscilación cíclica de dopamina de una manera dependiente de Ih.

3. DA Y PATRON DE LOCOMOCIÓN

3.1. EL PATRON DE DOPAMINA PARECE ESTAR INTIMAMENTE ASOCIADO AL PATRON DE ACTIVIDAD

La asociación entre dopamina y actividad está bien definida en mamíferos. En rata, la oscilación de dopamina se restringe a un incremento en los niveles durante la fase de oscuridad, coincidiendo con el periodo preferente de actividad locomotora (Gravotta et al., 2011).

Nuestros resultados muestran que, tal como estaba descrito en condiciones de LD, durante la fase de luz, las moscas control tienen un patrón bimodal de actividad locomotora (Figura 17B y 19). Sin embargo, en condiciones de ausencia de estímulo ambiental (DD) las moscas mantienen elevada la actividad durante el día subjetivo dando lugar a un patrón locomotor de meseta (Figuras 17D y 30; ver apartado 6). Del mismo modo, la dopamina oscila siguiendo un patrón bimodal durante el periodo de día en LD mientras que, durante el día subjetivo los niveles se mantienen en un estrecho rango de valores.

La aparentemente estrecha relación entre patrón locomotor y dopamina, nos hizo preguntarnos si la actividad locomotora podría estar afectada en los mutantes *Dmlh*, donde el patrón de oscilación de dopamina se pierde durante la fase de luz en condiciones de LD. Los mutantes *Dmlh* parece mostrar un patrón bimodal de locomoción menos marcado (Figura 18B), con los picos de actividad de llegada y pérdida de luz tamponados. Sin embargo, debido a que el análisis de medias de datos de locomoción puede enmascarar algunas características importantes, realizamos una inspección individual del comportamiento de cada mosca. El análisis de la frecuencia predominante de la ritmicidad (mediante FFT) reveló que, el 98,4% de los individuos control mostraban un patrón bimodal (periodo predominante de 12 horas) mientras que, prácticamente la mitad de los mutantes *Dmlh* (41,1%) seguían un patrón de meseta (periodo predominante de 24 horas) (Figura 19).

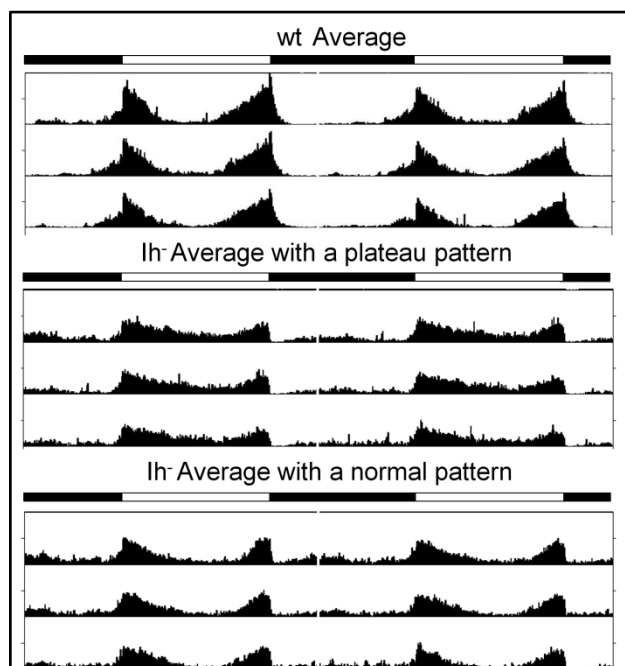


Figura 19. Los mutantes *DmIh* pierden el patrón bimodal característico de LD. Actogramas medios mostrando el patrón bimodal típico en la mayoría de moscas control (98,4%, $n=53$; panel superior) y en un 58,9% de las moscas mutantes *DmIh* (media de 33 moscas; panel inferior). Sin embargo, el resto de los mutantes (41,1%, $n=23$) muestran un patrón de meseta durante el periodo de luz (panel central).

Estos resultados sugieren una asociación entre el patrón de oscilación de la dopamina y el patrón locomotor, estando ambos afectados por luz.

Sin embargo, puesto que el gen *DmIh* se expresa en receptores de la retina (Marx et al., 1999), una de las cuestiones que nos planteamos es, si los mutantes nulos podrían presentar problemas de visión, en términos de percepción de luz, que contribuyeran a las diferencias en el patrón de locomoción encontradas. Un ensayo de fototaxia estándar (Sanchez et al., 2006) nos mostró que, mientras que las moscas control respondieron al test, los mutantes no mostraron una preferencia clara por el extremo iluminado. Sin embargo, el hecho de que sean capaces de mantener ritmos

locomotores en función de un estímulo lumínico (ritmos en LD) y que, el grupo de Birman (Riemensperger et al., 2011) ha descrito que, eliminar la dopamina neural provoca fallos en fototaxia positiva, sin alteración de la percepción visual ni la respuesta optomotora, nos hizo pensar que el resultado de este ensayo podría estar enmascarado por otro fenotipo independiente de la capacidad de percibir y/o responder a luz.

Con el fin de solventar este problema, realizamos un ensayo de locomoción con baja intensidad de luz (Hirsh et al., 2010). Los resultados del análisis de la actividad locomotora en estas condiciones (Figura 20) revelaron que los individuos deficientes son capaces de percibir intensidades de luz bajas (92,8% de los individuos, n=42), ajustando su ritmo locomotor al nuevo ritmo establecido de forma similar ($\chi^2_{(1)}=4,126$; $p=0,075$) a los controles (100%, n=56). Es interesante destacar la respuesta al cambio de intensidad y hora de aplicación de la luz, tanto de los mutantes como los controles, mostrada en el día de transición (5º día del experimento) donde ambos genotipos tienden a mantener una actividad sostenida debido al retraso en la llegada de la luz (6 horas después).

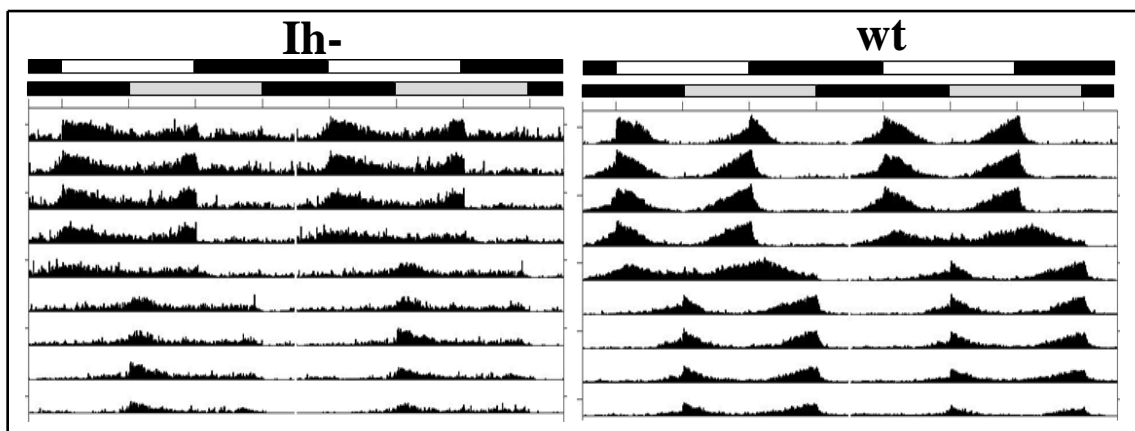


Figura 20. Los mutantes nulos *DmIh* son capaces de percibir luz a baja intensidad. Actogramas de ocho días consecutivos para individuos control (wt, n=56) y mutantes (*Ih-*, n=42). Las barras de los paneles superiores representan los periodos establecidos, a intensidad de luz alta (barra superior, donde las áreas blancas representan los periodos de luz y las negras los de oscuridad) y a intensidad baja (barra inferior, con un retraso de 6 horas respecto al anterior; las áreas grises corresponden a las fases de luz y las negras a oscuridad).

4. ESTUDIO DEL PATRON DE SUEÑO Y VIGILIA EN ADULTOS

4.1. LA AUSENCIA DE CORRIENTE *Ih* PROVOCA UNA FRAGMENTACIÓN DEL SUEÑO

El análisis de la actividad en términos cuantitativos, mostró que, durante el día, no hay diferencias en el tiempo que individuos mutantes *DmIh* y controles están despiertos. Sin embargo, la actividad total (pasos/día) es significativamente menor en los individuos mutantes (Figura 21B) debido a una disminución en los pasos/minuto activo, sugiriendo que las moscas mutantes *DmIh* son hipoactivas. Durante la noche, el escenario es completamente distinto en términos de actividad. Sorprendentemente los individuos deficientes para *DmIh* muestran un incremento significativo en el número de pasos/minuto activo comparado con los controles, aunque la actividad total no es distinta entre mutantes y controles (Figura 21B). Esto se puede explicar por un incremento de los periodos despierto sin actividad.

El análisis de los resultados determinó que el tiempo total de sueño, tanto en día como en noche, no es diferente entre moscas mutantes y control, mostrando que la regulación de la cantidad de sueño no está alterada (Figura 21B y C).

Sin embargo, las moscas deficientes *DmIh* mostraron un incremento en el número de episodios de sueño con disminución de su duración (Figura 21B y C). Esta tendencia a fragmentar el sueño es más pronunciada durante la fase de noche. De hecho, mientras que, en moscas control, el sueño total fue mayor durante la noche que durante el día debido a una inversión en el patrón de sueño (el número de episodios se reduce ligeramente mientras que su duración incrementa considerablemente), los individuos mutantes no mostraron esta inversión (Figura 21B y C).

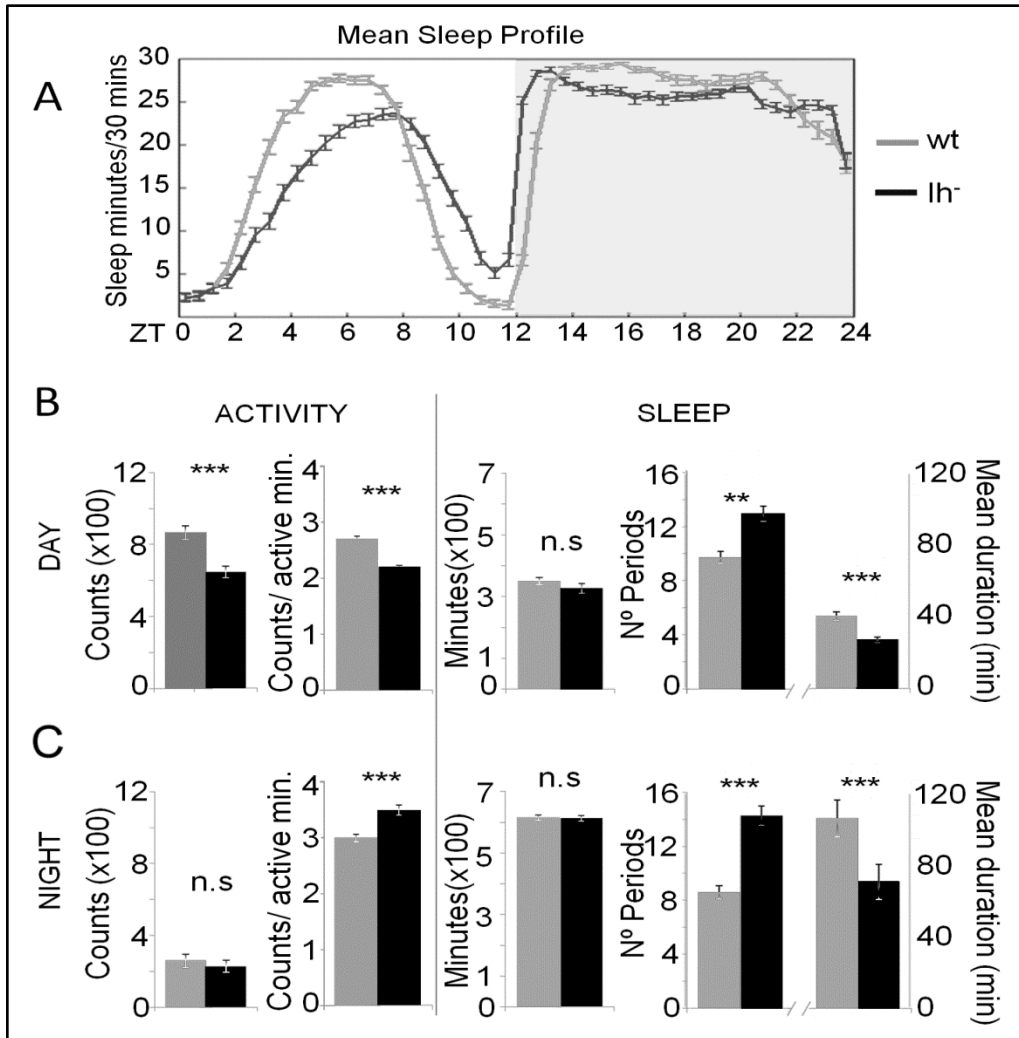


Figura 21. La ausencia de *Ih* afecta a la consolidación del sueño. A. Curvas de la cantidad diaria de sueño (intervalos de 30 min) en machos control ($n=64$) y mutantes *DmIh* ($n=64$) de 6 a 8 días de edad, en condiciones de LD. Las áreas blanca y gris indican los periodos de luz y oscuridad respectivamente. Cada punto representa la media \pm SEM. B. Parámetros de sueño: actividad para ambos genotipos durante la fase de luz. C. Parámetros de sueño: actividad para ambos genotipos durante la fase de oscuridad. Las barras de error representan el doble de la SEM. Los asteriscos marcan las diferencias significativas del test realizado por el programa Flysiesta (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s., no significativo).

La fragmentación del sueño es un fenotipo característico de envejecimiento y la consecuente acumulación de daño oxidativo. En condiciones de laboratorio el efecto del envejecimiento en la fragmentación del sueño no es perceptible hasta la cuarta

semana y nuestros registros de sueño:actividad fueron realizados en individuos de 6 a 8 días de edad. Además, aunque los individuos mutantes mostraron una reducción en la vida media (Figura 15A, apartado 1.1.1 de Resultados), no afectaba a edades tan tempranas y, sobre todo, no era consecuencia de un envejecimiento fisiológico prematuro, ya que no mostraron incremento de estrés oxidativo respecto a los controles (Figura 15B, apartado 1.1.1 de Resultados)

4.2. DISMINUIR LOS NIVELES DE DOPAMINA EN MUTANTES *Dmlh* RESCATA LA FRAGMENTACIÓN DEL SUEÑO

El fenotipo de fragmentación mostrado por los mutantes *Dmlh* podría ser una consecuencia de la alteración en los niveles de dopamina o, ser un efecto causado por la falta de corriente Ih. Para discriminar entre ambas alternativas, realizamos un ensayo disminuyendo farmacológicamente los niveles de DA mediante el suministro oral de 3-iodotiroxina (3IY 10mg/ml), un agonista competitivo de la enzima tiroxina hidroxilasa (TH), que reduce los niveles de dopamina sin afectar a comportamientos básicos ni la viabilidad (Bainton et al., 2000; Lebestky et al., 2009).

El análisis de los parámetros de sueño en estas condiciones revela que, tanto los mutantes *Dmlh* como los controles, aumentan la consolidación del sueño (Figura 22). Además, el número de los episodios de sueño (12.9 ± 0.8 y 11.4 ± 0.8 para moscas control y mutantes respectivamente durante la fase de luz; 8.4 ± 0.8 y 8.5 ± 0.8 para moscas control y mutantes respectivamente durante la fase de oscuridad) y su duración (en minutos, 46.6 ± 3.4 y 65.7 ± 6.6 para moscas control y mutantes respectivamente durante la fase de luz; 84.3 ± 10.2 y 87 ± 8.4 para moscas control y mutantes respectivamente durante la fase de oscuridad) no es significativamente distinto en los mutantes *Dmlh* tratados con la droga del mostrado por moscas control sin tratamiento ($p > 0,1$), indicando que, reducir los niveles de dopamina en los mutantes rescata la consolidación del sueño, sobre todo en la fase de noche, donde los niveles de dopamina se encuentran aumentados. Concretamente, el tratamiento con droga, durante la noche, incrementa la duración de los episodios un 58% en

mutantes *DmIh* ($p < 0,001$) frente al 39% en los controles ($p < 0,05$). Sin embargo, la aplicación de 3IY incrementa el sueño total solo en los individuos control sugiriendo que el efecto de la dopamina sobre el tiempo total de sueño ocurre, en cierta medida, a través de la modulación de la corriente Ih.

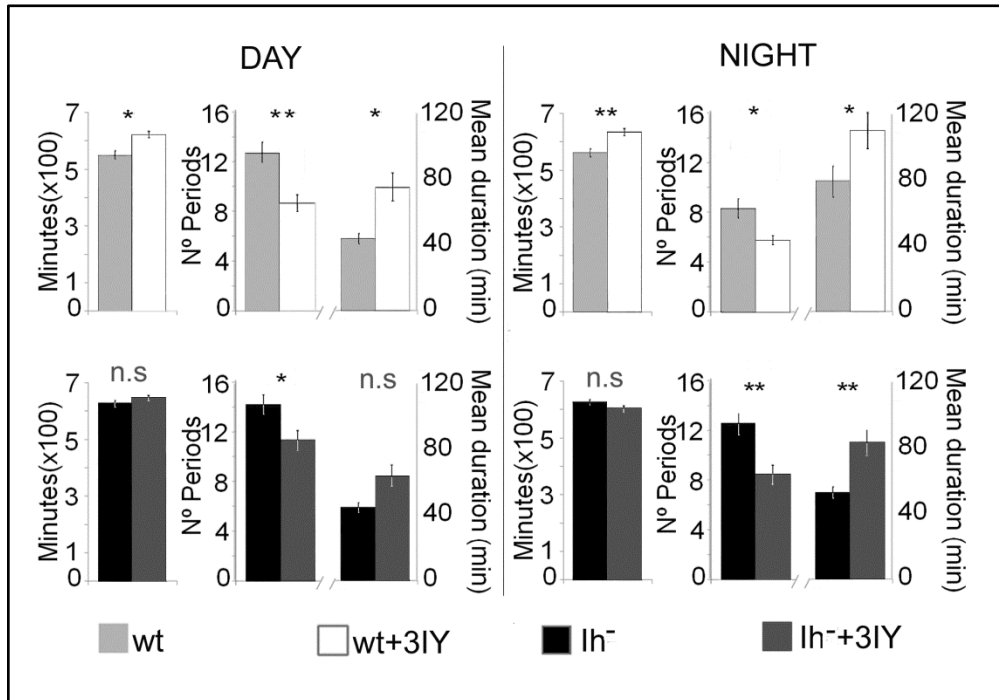


Figura 22. Disminuir los niveles de dopamina en mutantes *DmIh*, mediante 3IY, rescata el fenotipo de sueño. Parámetros de sueño en moscas control ($n=29$) y mutantes ($n=27$) bajo condiciones control (alimentadas con gelatina) o bajo tratamiento de droga (alimentadas con 10mg/ml de 3IY en gelatina) ($n=20$, para moscas control y $n=26$ para mutantes *DmIh*). Las barras de error representan el doble de la SEM. Los asteriscos marcan las diferencias significativas del test realizado por el programa Flysiesta (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s., no significativo).

4.3. ELIMINAR LA CORRIENTE I_h EN MOTONEURONAS RESULTA EN FENOTIPO HIPOACTIVO

El estudio de la actividad en individuos adultos parece mostrar que los mutantes nulos *DmIh* son hipoactivos durante el día en LD, puesto que presentan menor locomoción durante los periodos en que están activos (pasos/minuto activo, Figura 21B). Sin embargo, durante la noche, a pesar de que la actividad total es igual en mutantes que en controles, muestran cierta hiperactividad.

Estos cambios de actividad parecen estar relacionados con el patrón de los niveles de dopamina mostrado por los mutantes en ambos periodos (día y noche), pero además, no podemos olvidar que los mutantes son nulos para *DmIh*, de manera que la ausencia de esta corriente podría estar afectando, además de a nivel de sistema nervioso central, en otros puntos de control de la locomoción.

Con el fin de determinar el efecto de I_h en la locomoción, utilizamos una isoforma UAS: I_h^{DN} del gen *DmIh*. En mamíferos, se ha propuesto que diferentes subunidades HCN coensamblan formando canales a partir de complejos heteroméricos (Chen et al., 2001 y Ulens et al., 2001). De esta manera, la coexpresión de la isoforma truncada HCN1-AAA con subunidades wt del canal inhibe la corriente actuando como un dominante negativo (Xue et al., 2002).

Dirigiendo la isoforma I_h^{DN} a las motoneuronas (+;D42G4/UAS: I_h^{DN}) las moscas mostraron, durante el día, una actividad total menor que sus controles (Figura 23), que fue similar a la mostrada por el mutante nulo (691 pasos/día para D42 I_h^{DN} y 600 para mutantes *DmIh*, $p=0,5$) (Figura 21B). El número de pasos/minuto activo también fue similar al de individuos deficientes (2,3 vs 2,2; $p=0,2$) aunque en este caso no es distinto del mostrado por sus controles.

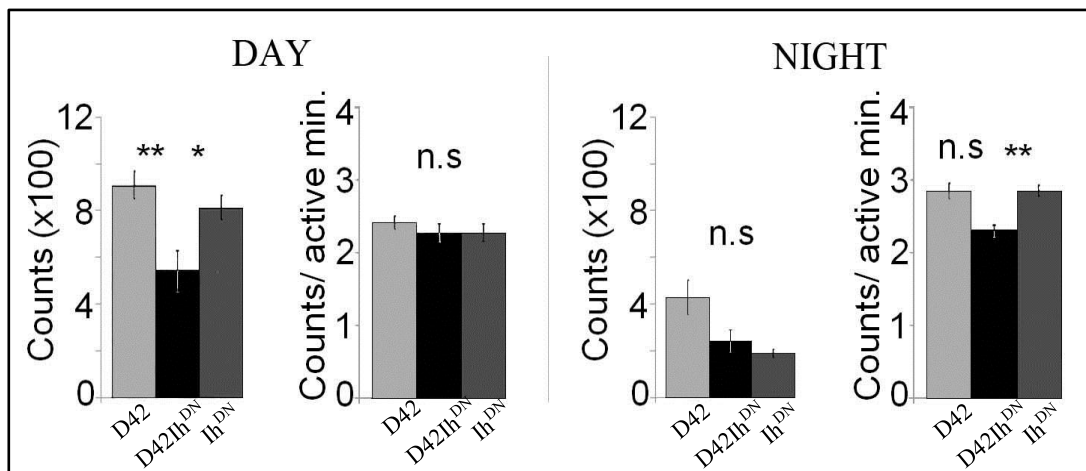


Figura 23. Eliminar la corriente Ih en las motoneuronas genera hipoactividad tanto en día como en noche. Parámetros de actividad registrados durante el día y la noche en individuos mutantes *D42G4IhDN* ($n=9$), y sus controles (*D42G4* y *IhDN*, $n=31$ para ambos). Las barras de error representan el doble de la SEM. Los asteriscos marcan las diferencias significativas del test realizado por el programa Flysiesta (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n.s., no significativo).

Durante la fase de noche, aunque no existen diferencias significativas en la actividad total, ni respecto a sus controles ni, respecto al mutante nulo *Dmlh*, si existe una reducción en el número de pasos/minuto activo (Figura 23) mientras que, en esta fase, los individuos deficientes (Figura 21C) mostraban un incremento de actividad (2,4 pasos/min *D42Ih^{DN}* vs 3,5 pasos/min activo mutantes nulos *Dmlh*; $p < 0,001$). Esta diferencia en la actividad, sin incremento del número total de pasos, entre el mutante *D42Ih^{DN}* y el deficiente *Dmlh*, se explica por una menor duración en estos últimos de los periodos activos durante la fase de noche (1,8 min vs 2,9 min. respectivamente; $p < 0,001$)

De estos resultados, podemos inferir que, en *Drosophila*, los canales Ih están también compuestos por diferentes subunidades formando complejos, puesto que la isoforma Ih^{DN} parece actuar como dominante negativo y que, eliminar la corriente Ih en las motoneuronas resulta en un fenotipo de hipoactividad tanto en día como en noche, realzando la posibilidad de que sea el incremento de dopamina el que dirige un aumento de la actividad en los periodos de noche en mutantes nulos *Dmlh*.

5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD EN LARVA III

El estudio de la actividad en adultos nos revela defectos en la locomoción de los individuos con alteraciones en la corriente Ih. Sin embargo, la realización de un estudio en profundidad requiere la utilización de un modelo, donde los parámetros y circuitos implicados en actividad, hayan sido bien caracterizados. Con el fin de arrojar luz sobre este punto, nos propusimos realizar un estudio detallado de la implicación de la corriente Ih en larva de estadio III puesto que, tanto la morfología y electrofisiología de la unión neuromuscular (NMJ), como el comportamiento locomotor, están ampliamente descritos en este modelo.

5.1. ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA DE LA NMJ EN MUTANTES NULOS PARA *DmIh*.

Para determinar si, la pérdida de corriente Ih, provoca un cambio en la morfología de los terminales, analizamos los botones sinápticos en los músculos 6/7 del segmento 3 mediante inmunodetección de HRP. Los resultados mostraron que la ausencia de corriente Ih provoca una dramática reducción en el número de botones sinápticos en la terminación neuromuscular (Figura 24), un fenotipo asociado con hipoexcitabilidad. El análisis del tamaño medio de los botones reveló que, en contra de lo esperado para mutantes hipoactivos (Lnenicka et al., 2003), los mutantes *DmIh* muestran un incremento comparado con el control. Sin embargo, realizando una inmunodetección contra Brunchpilot (BRP) encontramos que este incremento en el tamaño no está asociado a un incremento de actividad puesto que el número de sitios activos (zonas de liberación sináptica) en el terminal sináptico, es menor en los mutantes nulos *DmIh* (Figura 24).

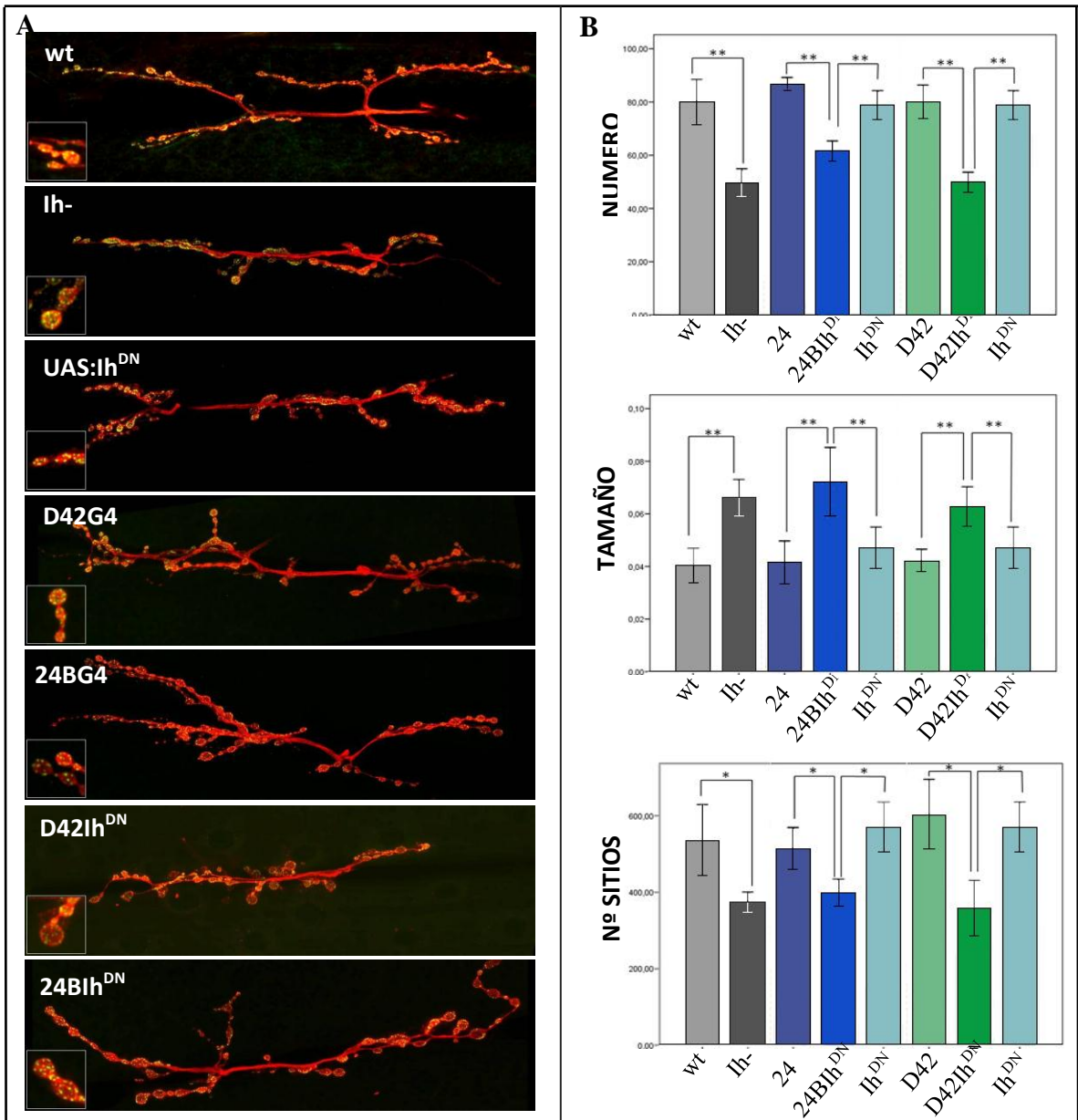


Figura 24. La ausencia de corriente Ih provoca un fenotipo de hipoexcitabilidad en la NMJ larvaria. Analisis de la NMJ en individuos control (wt, n=8), mutantes nulos para DmIh (Ih⁻, n=7), mutantes dirigidos a motoneuronas y músculo (D42Ih^{DN}, n=7 y 24BIh^{DN}, n=8 respectivamente) y sus controles (D42, n=5; 24B, n=5 y Ih^{DN}, n=8). **A.** Proyecciones de confocal a 60X, donde se visualiza con anti-HRP (rojo) la membrana del terminal sináptico y con anti-nc82 (verde) los sitios activos de liberación. **B.** Representación del promedio de datos para cada parámetro analizado. Eliminar la corriente Ih en todo el individuo tiene el mismo efecto sobre la morfología de la NMJ que eliminarla pre- o post-sinápticamente (*p < 0.05; **p < 0.01).

Este resultado nos indica que la pérdida de corriente I_h , no parece impedir la formación de los terminales, pero sí parece estar implicada en la correcta proliferación y/o maduración de los botones sinápticos.

5.2. LA CORRIENTE I_h ESTÁ IMPLICADA PRE Y POST-SINÁPTICAMENTE EN EL DESARROLLO DE LA NMJ.

Con el fin de tratar de determinar si el fenotipo encontrado en la morfología se debe a un efecto pre- o post-sináptico de la ausencia de corriente I_h , dirigimos la expresión de la isoforma I_h^{DN} , a motoneuronas (D42G4) o músculo (24BG4), donde obtuvimos el único resultado positivo de hibridación *in situ* de RNA revelando expresión del gen *DmIh* en los músculos larvarios (Figura 25). Los resultados mostraron que, dirigiendo la isoforma I_h^{DN} desde ambos promotores, el fenotipo fue similar al obtenido en mutantes nulos *DmIh*, consistente en un menor número de botones con un incremento del tamaño medio, así como una reducción en el número de sitios activos en la terminación (Figura 24).

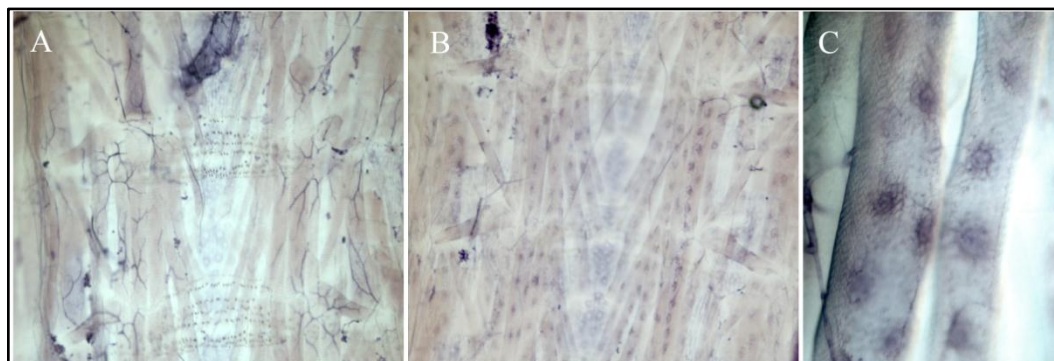


Figura 25. Expresión de *DmIh* en el músculo de larva III. A y B. Imágenes tomadas en microscopio óptico (10X) de la pared muscular de larva III. A. Control negativo (sonda sense). B. Visualización de la expresión de *DmIh* en el músculo (sonda antisense). C. Detalle de la expresión de *DmIh* a 40X.

El hecho de que, en ambas situaciones, el resultado fuera similar al mostrado por los mutantes nulos sugiere que la corriente I_h afecta durante el desarrollo de la NMJ tanto pre- como post-sinápticamente.

5.3. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO LOCOMOTOR

Con el fin de averiguar si los defectos morfológicos tienen implicaciones funcionales *in vivo*, estudiamos el comportamiento locomotor de larva en estadio III. En *Drosophila*, las larvas de este estadio muestran patrones estereotipados consistentes en episodios distinguibles de locomoción, y paradas de búsqueda o decisión (Wang et al., 1997).

Los ensayos de *tracking* revelaron que, los mutantes nulos para *Dmlh* muestran una reducción de la velocidad y la distancia recorrida, con un incremento significativo del tiempo no activo (numero de paradas) comparado con las moscas control (Figura 26A). También se vio incrementado el número de cambios de dirección (Figura 26A).

Eliminar la corriente Ih en las motoneuronas (D42Ih^{DN}) tiene también un efecto sobre la media de la velocidad y distancia recorrida de estos individuos, disminuyendo ambos parámetros respecto a sus controles. Sin embargo, el número de cambios de dirección no fue significativamente distinto (Figura 26A). Esto podría ser explicado por el hecho de que, estos movimientos que implican toma de decisiones, son generados por el sistema nervioso central (revisado en Peron et al., 2009). Tampoco se registró un incremento en el número de paradas, por lo que también parece un fenotipo atribuible al sistema nervioso central.

Del mismo modo, tanto los mutantes nulos *Dmlh*, como aquellos que tienen dirigida la isoforma Ih^{DN} en motoneuronas (D42Ih^{DN}) presentan defectos en la propagación de las contracciones peristálticas. Ambos, muestran un incremento significativo de la frecuencia, mientras que *Dmlh*-, pero no D42Ih^{DN}, reduce la zancada (Figura 26B). Estudios acerca del papel de la actividad eléctrica en la regulación de las ondas peristálticas han encontrado que existe un efecto compensatorio entre la fuerza y la frecuencia de la contracción en mutantes para canales iónicos (Wang et al., 2002). Nuestros resultados mostraron que este efecto compensatorio se cumple en el mutante nulo *Dmlh*, pero no en la mutación

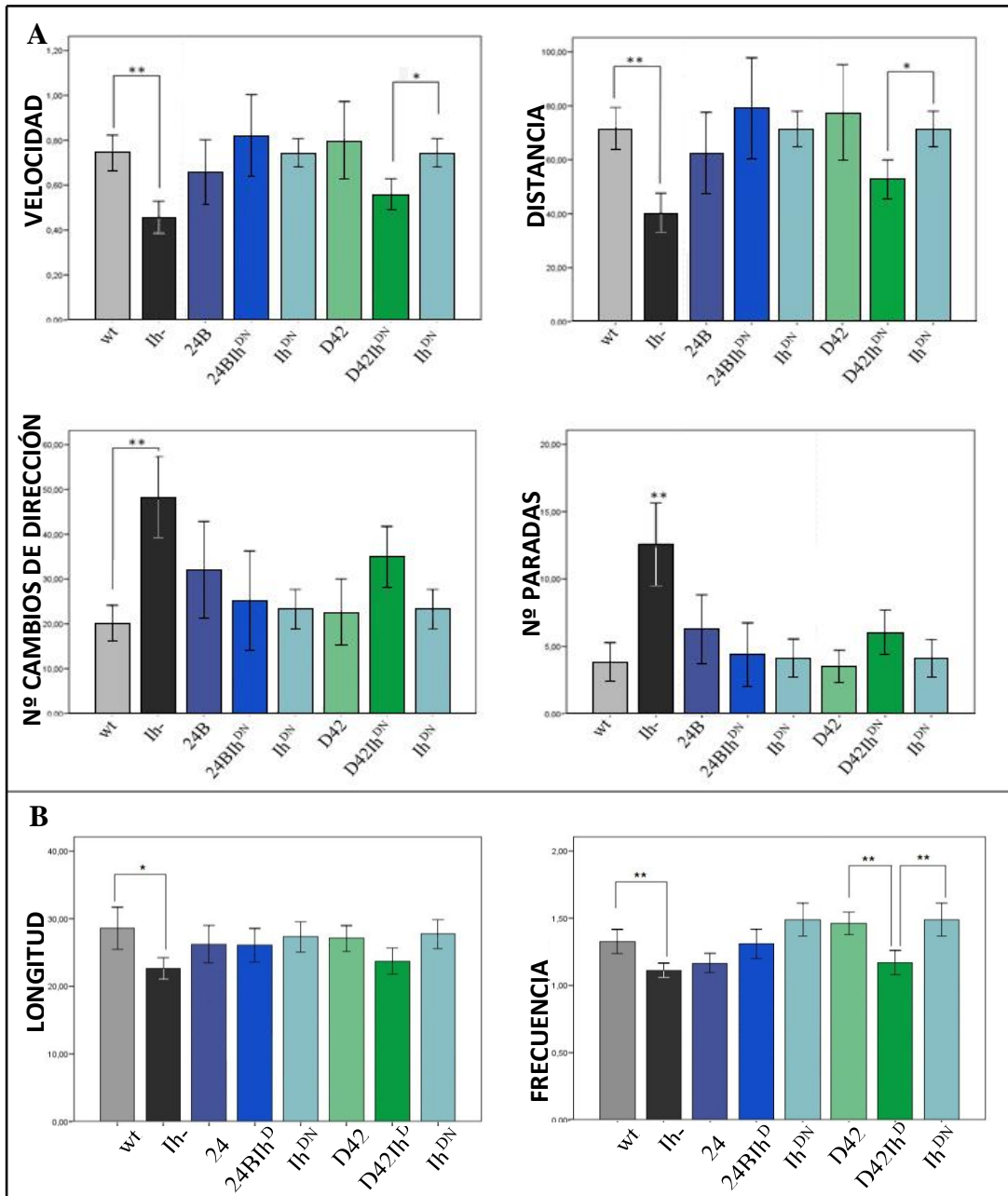


Figura 26. Los mutantes nulos *DmIh* presentan defectos en la locomoción de larva III, provocados por la ausencia de la corriente *Ih* en las motoneuronas y/o el sistema nervioso central. Representación del promedio de datos obtenido **A.** Análisis de los parámetros obtenidos a partir de los ensayos de tracking en controles (wt, n=13), mutantes nulos *DmIh* (*Ih*-, n=12), mutantes dirigidos a motoneuronas y músculo (*D42Ih^{DN}*, n=16 y *24BIh^{DN}*, n=10 respectivamente) y sus controles (*D42G4*, n=11; *24BG4*, n=12 y *Ih^{DN}*, n=14). **B.** Análisis de los parámetros obtenidos en el estudio de las ondas peristálticas en controles (wt, n=9), mutantes nulos *DmIh* (*Ih*-, n=9), mutantes *D42Ih^{DN}* (n=10) y *24BIh^{DN}* (n=9) y sus controles *D42G4* (n=13), *24BG4* (n=9) y *Ih^{DN}* (n=9). (**p* < 0.05; ***p* < 0.01).

dirigida con D42G4. Aunque este driver se ha descrito como un driver de motoneuronas, se ha visto que su expresión también se amplía a interneuronas (Parkes y col. 1998) y, ambas (motoneuronas e interneuronas) han sido implicadas en la regulación de las ondas peristálticas (Hughes and Thomas, 2007).

Es interesante destacar que, a pesar de los defectos encontrados en la morfología de la NMJ de los mutantes 24BIh^{DN}, estos individuos no parecen mostrar ningún defecto en la locomoción (Figura 26A y B).

5.4. ESTUDIO DE ELECTROFISIOLOGÍA EN LA NMJ.

Los defectos en la morfología de la NMJ son consistentes con los fenotipos de hipoactividad encontrados en el mutante nulo *DmIh* y el mutante D42Ih^{DN}. Sin embargo, el mismo fenotipo morfológico en mutantes 24BIh^{DN} no conlleva ningún defecto de locomoción. Para entender qué diferencia estas terminaciones y, poder determinar el efecto fisiológico de eliminar la corriente Ih, realizamos un estudio electrofisiológico en colaboración con el laboratorio del Dr. De Polavieja. El ensayo, consistió en la realización de registros intracelulares de los músculos 6 y 7 en los segmentos A3 y A4 de larva III (ver material y métodos) de todos los genotipos.

En primer lugar analizamos la actividad espontánea de la NMJ seccionando el nervio y registrando los potenciales excitatorios postsinápticos miniatura (mEJPs), generados en el músculo y, causados por la liberación espontánea de una única vesícula. La amplitud de los mEJPs fue significativamente mayor en los individuos nulos *DmIh* así como en D42Ih^{DN} con un incremento medio del 28% y 34% respectivamente, mientras que no se encontraron diferencias significativas para los mutantes 24BIh^{DN} (Figura 27). No encontramos cambios en la frecuencia de los mEJP en ningún genotipo, así como tampoco cambios en el potencial de reposo de la membrana muscular (Figura 27).

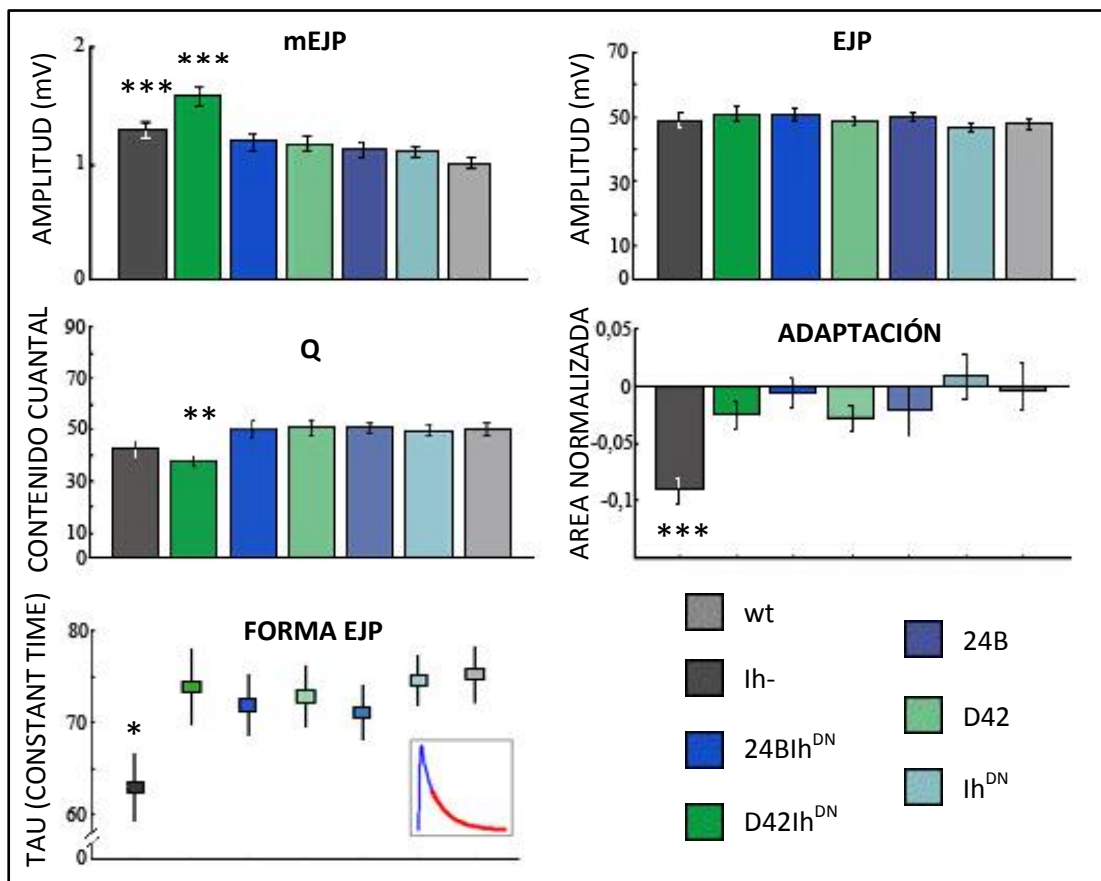


Figura 27. Electrofisiología de la NMJ larvaria. Representación de los datos promedio para la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios miniatura (mEJP), amplitud de los potenciales evocados (EJP), contenido cuantal (Q), adaptación (área normalizada, representando la diferencia entre la amplitud de los EJP entre la obtenida en el protocolo escalonado de incremento de intensidad del estímulo y el de disminución; ver material y métodos) y forma del EJP, donde la curva representa el potencial generado en el músculo marcando en rojo el área utilizada para la medición de la anchura (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

Los potenciales evocados (EJPs) fueron realizados mediante estimulación del nervio seccionado, a una frecuencia de 0,5 Hz. No encontramos diferencias en ningún caso en la amplitud (Figura 27). Sin embargo, considerando que encontramos diferencias en la amplitud de los mEJPs, calculamos el contenido cuantal (Q) como la amplitud media de los EJPs dividido la amplitud media de los mEJPs. Este parámetro nos da una estimación de la cantidad de vesículas liberadas en el potencial evocado. Los

resultados mostraron que el terminal de los individuos D42Ih^{DN}, tiene una reducción del 25,9% en el Q comparado con sus controles, es decir, libera menor número de vesículas para disparar potenciales evocados de igual amplitud. El mutante nulo *Dmlh* muestra una reducción también que no llega a ser significativa comparada con el control (-13.1%, $p=0.063$), mientras que los individuos 24BIh^{DN} no muestran ninguna diferencia (Figura 27).

El análisis de la forma de los potenciales evocados, reveló una reducción en la anchura de la curva de la respuesta del 16,2% en los mutantes nulos para Ih, mostrando que el potencial evocado en el músculo decae más rápido en estos individuos (Figura 27).

La dinámica de la respuesta de la NMJ mostró que, la ausencia de corriente Ih (mutantes nulos *Dmlh*) provoca adaptación comparado con su control, mientras que expresar la isoforma Ih^{DN} pre- o post-sinápticamente no tuvo efecto en la dinámica (Figura 27).

5.4.1. BLOQUEAR LA CORRIENTE Ih REDUCE LA RESPUESTA DE LA NMJ AFECTANDO A LAS MOTONEURONAS

Con el fin de ahondar en la función fisiológica de la corriente Ih, se usó un bloqueador específico de esta corriente (ZD7288) para intentar diferenciar los efectos fisiológicos provocados por la falta de Ih, de los posibles efectos compensatorios del desarrollo. ZD7288 ha sido utilizado previamente en preparaciones de mamíferos (Neuhoff et al., 2002; Puopolo et al., 2007; George et al., 2009), pero hasta el momento no se ha descrito su eficacia en *Drosophila*.

Los resultados (Figura 28) mostraron que la aplicación del bloqueante ZD7288 en individuos control, disminuye significativamente la amplitud de los EJP registrados en el músculo, comparado con el control con suero salino ($p<0,001$). Sin embargo no se registro ningún efecto en mutantes nulos *Dmlh*, que no mostraron diferencias significativas con el control en suero salino, mientras que sí fue distinto del control con droga ($p<0,001$). Estos datos determinan que la droga ZD7288, no sólo tiene

efecto en *Drosophila*, sino que, al igual que en mamíferos, es un bloqueante específico de la corriente I_h .

Del mismo modo, los registros obtenidos en individuos $D42Ih^{DN}$, no se ven afectados por la aplicación de la droga ($p=0,71$ comparado con control en suero salino; $p<0,01$ comparado con sus respectivos controles), mientras que los mutantes dirigidos $24BIh^{DN}$ si responden a droga disminuyendo la amplitud de los EJP ($p=0,89$ respecto sus controles; $p<0,05$ respecto al control en suero salino) (Figura 28).

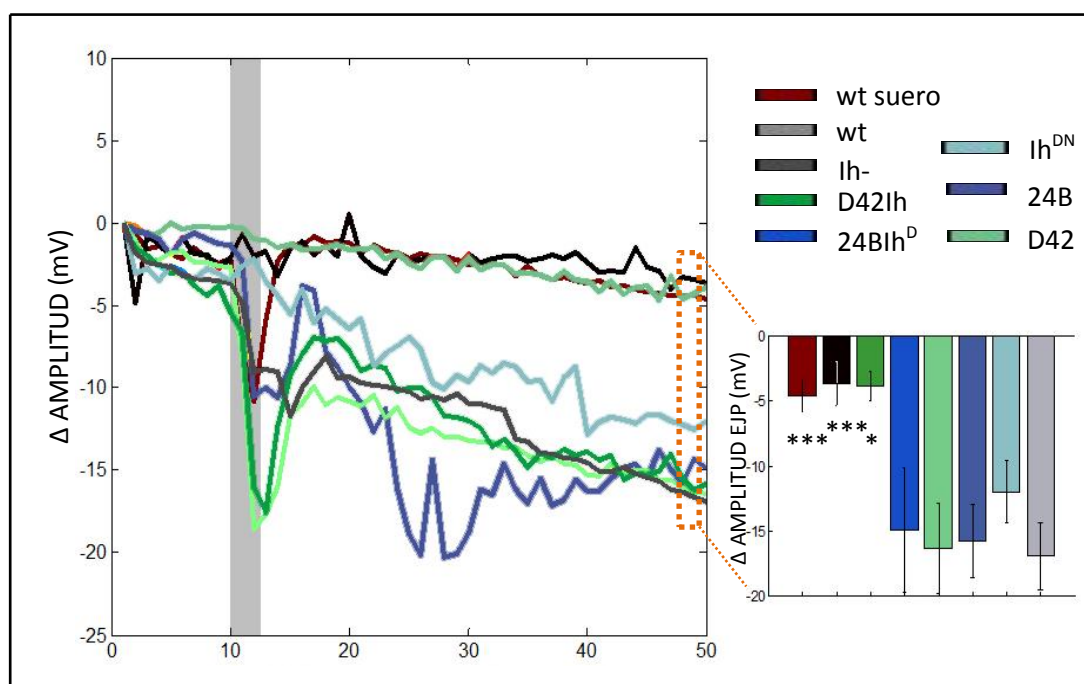


Figura 28. Bloquear la corriente I_h en el terminal sináptico, pero no es en músculo, disminuye la amplitud del EJP. Registro de la amplitud del EJP obtenido a lo largo de 50 repeticiones para cada genotipo, mostrando la diferencia en la amplitud del EJP desde la aplicación de droga (ZD7288, área gris) al final del experimento, representada en más detalle en el diagrama de barras. Además de todos los genotipos estudiados utilizamos un control negativo adicional (individuos wt con aplicación de suero salino). La droga reduce la amplitud de la respuesta en todos los genotipos excepto en mutantes nulos $Dmlh$ y mutantes $D42Ih^{DN}$, demostrando que es un bloqueante específico de la corriente I_h , y que su efecto es presináptico (** $p<0,001$, ** $p<0,01$).

En resumen, podemos inferir de los datos, que el efecto de bloquear la corriente I_h es presináptico.

6. ESTUDIO DE LA RITMICIDAD CIRCADIANA

Se han realizado numerosos experimentos con el fin de caracterizar eléctricamente a las células del reloj (Meredith et al., 2006; Fernández et al., 2007). Las características de la corriente I_h , su regulación por cAMP y por tanto por distintos neuromoduladores, algunos de ellos con oscilaciones circadianas, nos hizo pensar que eliminar dicha corriente podría implicar alteraciones en el control circadiano.

6.1. LOS INDIVIDUOS *DmIh*- SON RÍTMICOS EN CONDICIONES DE LD

En condiciones de LD, el análisis del periodo revela que, el 100% de las moscas control fueron rítmicas, manteniendo un periodo promedio de 23,85h (Figura 29, Tabla 1).

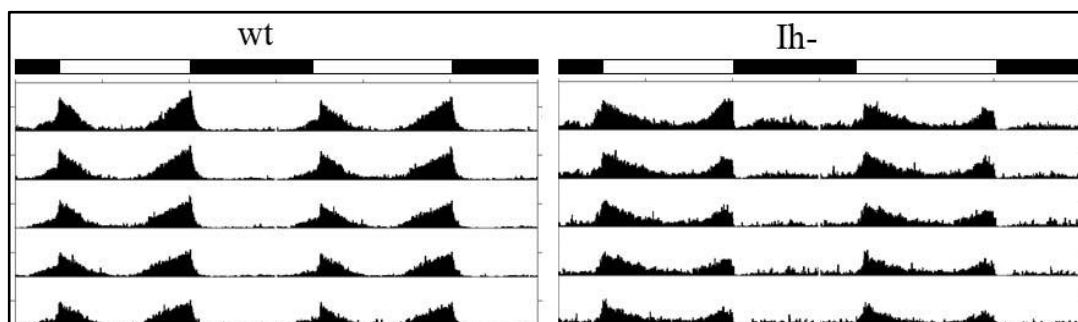


Figura 29. Los mutantes *DmIh* son rítmicos en condiciones LD. Actogramas medios mostrando la locomoción durante 6 días de individuos control (*wt*, $n=60$) y mutantes *DmIh* (*Ih*-, $n=58$). Las barras superiores indican los periodos de luz (barras blancas) y oscuridad (barras negras)

El porcentaje de individuos rítmicos decae ligeramente al analizar los mutantes nulos para *DmIh*. De los 58 individuos testados el 82,7% mostró ritmos robustos de locomoción mientras que el 17,3% restante mostró ritmicidad débil. El periodo promedio de estos individuos fue similar al de los controles (23,85h) (Figura 29, Tabla 1). No fueron detectados individuos arrítmicos en condiciones de LD. Los patrones de locomoción son similares entre individuos control y mutantes nulos

DmIh, aunque en estos últimos, se observa el tamponamiento de los picos de locomoción al amanecer y anochecer, así como el incremento de locomoción durante la noche, que ya hemos descrito en apartados anteriores.

		%R	%WR	%A		Periodo	
LD	wt (n=60)	100			(p<0.001)	23.85±0.008	
	lh ⁻ (n=58)	82.7	17.3			23.86±0.01	
DD	wt (n=47)	76.6	19.2	4.2	(p<0.0001)	23.81±0.05	(p<0.001)
	lh ⁻ (n=53)	24.53	52.83	22.64		23.26±0.09	

Tabla 1. Parámetros rítmicos. Porcentaje de moscas rítmicas (R), débilmente rítmicas (WR) y arrítmicas (A) en condiciones LD o DD. El periodo (media ± SD) se calculó mediante χ^2 periodograma utilizando las moscas rítmicas y débilmente rítmicas. La estadística marca las diferencias encontradas entre controles y mutantes en porcentaje de individuos R, WR o A (test χ^2), y en el periodo (test Mann-Withney).

6.2. EN AUSENCIA DE ESTÍMULO AMBIENTAL, LOS INDIVIDUOS MUTANTES NULOS *DmIh* PIERDEN RITMICIDAD Y ACORTAN EL PERIODO.

En ausencia de estímulo lumínico que coordine el periodo, las moscas muestran su ritmicidad endógena. En la figura 30 se muestra el patrón de locomoción de individuos control que, bajo estas condiciones (DD), consiste en un característico patrón de meseta derivado de una actividad sostenida durante el día subjetivo, con niveles bajos de actividad durante la noche subjetiva. El análisis de ritmicidad reveló que, el 76,6% de los individuos control mostraron ritmos robustos, mientras que un 19,2% mostraron ritmicidad débil. El periodo promedio de estos individuos fue indistinguible del mostrado en condiciones de LD (23,81h). Además detectamos un 4,2% de individuos arrítmicos (Tabla 1).

El análisis en individuos mutantes revela una clara pérdida de ritmicidad (Figura 30 y Tabla 1). A falta de un estímulo coordinador (luz) solo el 24,3% de los individuos son capaces de mantener ritmos robustos, incrementándose significativamente el porcentaje de individuos que mantienen ritmos débiles (52,83%) y, de individuos arrítmicos (22,64%). Además, aunque el patrón de locomoción muestra actividad

sostenida durante el día subjetivo, hay un decaimiento de dicha actividad hacia la segunda mitad de este periodo.

Sin embargo, el fenotipo más llamativo es un acortamiento del periodo a 23,26h (Figura 30 y Tabla 1), siendo significativamente distinto al mostrado por individuos controles y, sugiriendo que la ausencia de corriente I_h provoca anomalías en el control circadiano.

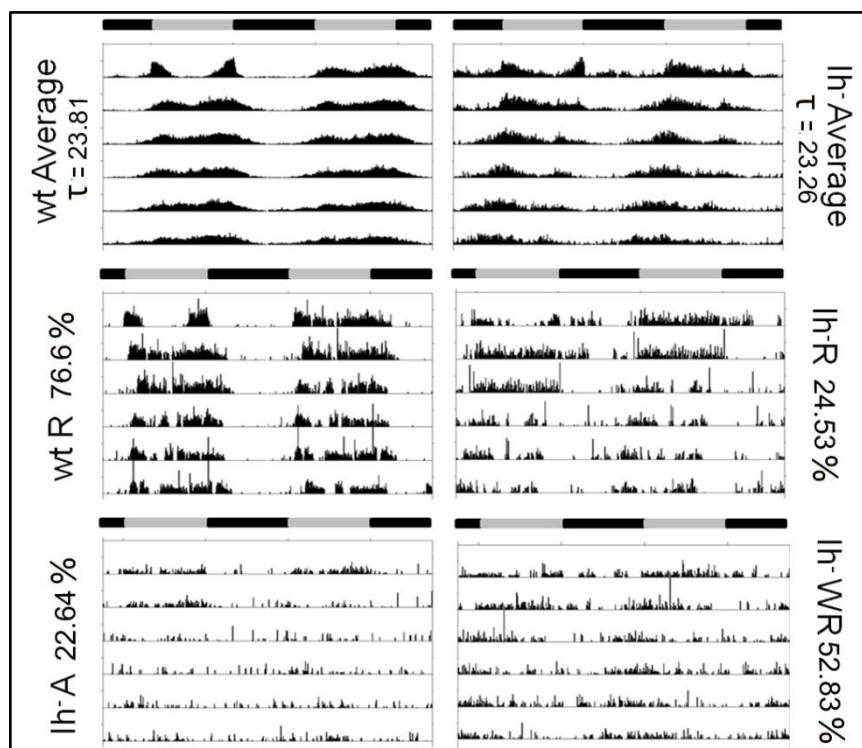


Figura 30. En DD, los mutantes *DmIh* acortan el periodo circadiano. Actogramas de la media (paneles superiores) y moscas individuales representativas (paneles centrales e inferiores) para mutantes (*Ih-*) y control (*wt*). El primer día de cada actograma corresponde al último día en condiciones LD. Las moscas mutantes mostraron fenotipos rítmicos (*Ih-R*), débilmente rítmicos (*Ih- WR*) y arrítmicos (*Ih-A*) (ver tabla 1).

6.3. LA CORRIENTE I_h AFECTA DOWSTREAM PDF

En condiciones de ausencia de estímulo ambiental, las neuronas s-LNvs, han sido descritas como el marcapasos del reloj, a través de la liberación rítmica de PDF, el principal eferente encargado de la locomoción (Shang et al., 2008).

Por ello, con el fin de comprobar si el acortamiento de periodo observado en mutantes *DmIh* era una consecuencia de la desregulación de PDF, realizamos una inmunodetección para esta proteína a CT2 y CT14 en individuos mutantes y control durante el tercer día de DD.

Los resultados (Figura 31) muestran que no existen diferencias significativas en la oscilación de la liberación de este factor en las terminaciones de las s-LNvs en el protocerebro dorsal, de manera que la alteración del periodo provocada por la ausencia de corriente I_h parece deberse a un efecto downstream de PDF.

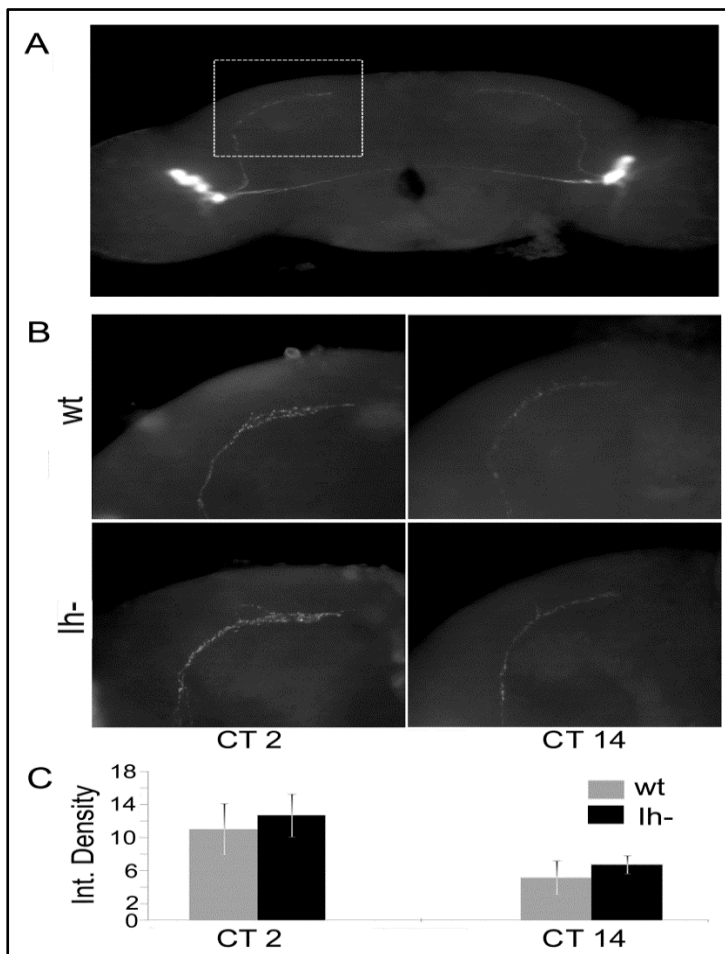


Figura 31. La ausencia de *Ih* no altera la oscilación de PDF en los terminales de las LNvs en condiciones de DD. **A.** Inmunodetección de PDF en cerebro de adulto mostrando las células LNvs y sus proyecciones dorsales. La línea punteada muestra el área seleccionada para el análisis. **B.** La oscilación de PDF en las proyecciones dorsales, analizada el tercer día en DD, muestra una oscilación normal en individuos control (*wt*) y mutantes nulos *DmIh* (*Ih*-) con elevados niveles al comienzo del día subjetivo (CT2) y bajos durante la noche temprana subjetiva (CT14). **C.** Cuantificación de la fluorescencia (Densidad integrada) en *wt* y *Ih*- a CT2 y CT14 (las barras de error indican desviación estándar) Entre ambos genotipos no existen diferencias significativas ($t_{13}=-1.121$, $p=0.283$ para CT2; $t_{11}=-1.794$, $p=0.100$ para CT14).

6.4. LA EXPRESIÓN DEL GEN *Dmlh* OSCILA DENTRO DEL INTERVALO CIRCADIANO

A la vista de los resultados obtenidos y con el fin de ahondar en la implicación de la corriente *Ih* en el control circadiano, nos planteamos si podría existir una regulación de su expresión génica, como sucede para otros genes implicados en ritmicidad.

Con el fin de validar esta hipótesis, realizamos una cuantificación del mRNA en cabezas de individuos adultos *wt*, mediante PCR cuantitativa a tiempo real (QRT-PCR), a dos ZT (0 y 12) para los que está descrita una oscilación de los principales genes implicados en ritmicidad circadiana.

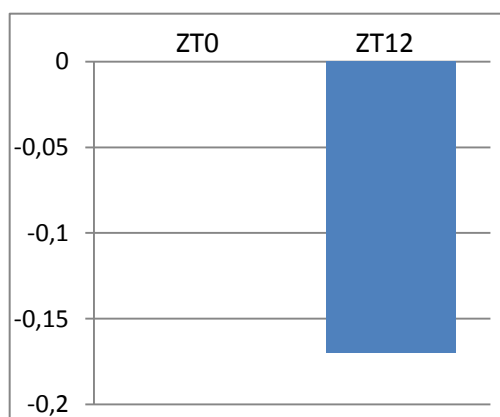


Figura 32. La expresión del gen *Dmlh* oscila. Niveles de expresión del gen *Dmlh* a ZT0 y ZT12 en *wt*. Los valores del eje de ordenadas están expresados en \log_{10} .

Los resultados, mostrados en términos de cuantificación relativa respecto ZT0, indican que la expresión del gen *Dmlh* oscila, mostrando mayores niveles de expresión al inicio del día (ZT0) y menores al inicio de la noche (ZT12) (Figura 32), de manera que si existe una regulación transcripcional dentro del rango circadiano. No descartamos que, además pueda existir una modulación de su activación a través de AMPc.

DISCUSIÓN

El estudio de corrientes que operan a potenciales cercanos al reposo, se ha convertido en un factor fundamental para comprender los mecanismos que regulan la excitabilidad celular. Entre ellas, la corriente I_h emerge como un importante determinante. Su activación cinética diferencial dependiente de isoforma y de la localización subcelular, le atribuye la capacidad de modular muchos de los procesos que subyacen al patrón de disparo neuronal. La implicación de esta corriente en la señalización dopaminérgica ha sido sugerida por numerosos estudios realizados en mamíferos (18-22).

En este trabajo mostramos, por primera vez, la existencia de oscilación de los niveles de dopamina en *Drosophila*, tanto circadiana, como mediada por luz, y aportamos importantes evidencias acerca de la implicación de la corriente I_h en el mantenimiento de los niveles fisiológicos de este neuromodulador. Además, mutantes nulos para *DmIh* muestran defectos en la consolidación del sueño, asociados a los niveles aberrantes de dopamina, defectos en la actividad y fallos en el control circadiano.

La corriente I_h tiene un importante papel en el control de la actividad rítmica en células marcapasos cardiacas así como en la modulación de la excitabilidad neuronal. Pero además está implicado en un elevado número de funciones no marcapasos que

incluyen la determinación del potencial de membrana en reposo, la integración dendrítica, la transmisión sináptica y el aprendizaje. Por ello, alteraciones de la función de los canales HCN, están implicadas en la patología de enfermedades cardiacas y del sistema nervioso en mamíferos, emergiendo como importantes dianas farmacológicas. Sin embargo, la falta de un bloqueante específico para cada una de las isoformas que componen el canal en los distintos grupos celulares, hace imprescindible conocer las consecuencias de eliminar totalmente la corriente I_h en la búsqueda hacia nuevas terapias. La existencia de 4 genes HCN en mamíferos, imposibilita la generación de un mutante nulo. Nosotros, hemos aprovechado la existencia en *Drosophila* de un único gen que codifica para I_h (*DmIh*) para generar un mutante de falta de función.

1. LA REGULACIÓN DE LA OSCILACIÓN Y DE LOS NIVELES DE DOPAMINA EN *Drosophila*, IMPLICA A LA CORRIENTE I_h .

La corriente I_h es un determinante de la frecuencia de disparo de numerosos tipos neuronales, entre ellos, se ha descrito en mamíferos, su implicación en las células dopaminérgicas, donde I_h facilita la tasa de disparo espontánea de estas células (Beckstead and Phillips, 2009). En dos modelos de locomoción de ratón clasificados como rápidos y lentos, se encontró que el aumento de locomoción correlaciona con un incremento de la densidad de canales I_h en las células dopaminérgicas (Beckstead & Phillips, 2009). Estos resultados parecen sugerir una relación directa entre la cantidad de canales HCN y la señalización dopaminérgica, sin embargo, no existen evidencias de esta asociación.

A diferencia de mamíferos, en *Drosophila*, no se ha demostrado la existencia de oscilación de los niveles de dopamina, aunque diversos estudios sugieren esta posibilidad (Andreatic and Hirsh, 2000; Ceriani et al., 2002; Hirsh et al., 2010).

Nuestros datos sobre los niveles de dopamina, están analizados en cabezas completas de individuos adultos. Nuestros intentos de medir dopamina en cerebro han demostrado que el tiempo de disección es crítico, puesto que, la dopamina

rápidamente se oxida imposibilitando la obtención de niveles detectables y/o replicables. Además, el mantenimiento de las moscas en hielo durante el tiempo de disección (1 hora) podría implicar cambios fisiológicos que modificaran los niveles de dopamina. Sin embargo, hay varias razones que apoyan que nuestros datos reflejan la dopamina existente en cerebro. Por un lado, el 70% de los niveles de dopamina encontrados en cabezas corresponden al cerebro (Borycz et al., 2008). Por otro lado, el transcrito de *pale*, que codifica para tirosina hidroxilasa, muestra oscilación en cabezas pero no en cuerpos (Ceriani et al., 2002), sugiriendo que la dopamina hipodérmica no está bajo control circadiano.

En condiciones de LD, durante la fase de luz, los niveles de dopamina muestran dos picos, mientras que durante la noche se mantienen niveles bajos que aumentan hacia el final de la fase de oscuridad para marcar un mínimo con la llegada de la luz. Esta caída parece actuar como un mecanismo de control de los niveles, reajustando la cantidad de dopamina, para comenzar de nuevo el ciclo. El análisis de la contribución de la señal de luz versus control circadiano en la oscilación de la dopamina, a través de la comparación de los valores obtenidos en LD y DD, mostró que el patrón bimodal durante el día está conducido por la luz, mientras que los niveles se encuentran bajo control circadiano.

El mecanismo por el cual, la luz, es capaz de modular los niveles de dopamina, no se conoce, pero parece ser dependiente de *Ih*, puesto que, los mutantes nulos para este gen, pierden la oscilación durante el día. El hecho de que el gen *DmIh* se exprese en los fotorreceptores podría suponer que los individuos mutantes presentarían problemas de visión que contribuirían a explicar las diferencias encontradas. Sin embargo, los mutantes son capaces de ser entrenados a baja intensidad de luz, por lo que, eliminamos la posibilidad de que la falta de oscilación en los niveles de dopamina, sea consecuencia de defectos en la percepción de la luz, aunque no podemos eliminar la posibilidad de que la corriente *Ih* afecte al circuito de recepción y/o transmisión de la información visual al sistema nervioso central. De hecho, en pacientes con cardiopatías, tratados con bloqueantes de la corriente *Ih*, se han registrado la aparición de fosfenos (respuestas visuales que no están provocadas por

cambios en la luz), debido al bloqueo de la corriente I_h en los fotorreceptores y células bipolares (Cervetto et al., 2007), sugiriendo un papel de I_h en el procesamiento de la información visual.

No solo la oscilación de la dopamina está mediada por I_h , sino también el mantenimiento de los niveles, puesto que, durante las fases de oscuridad (tanto durante la noche en condiciones de LD, como en DD) la ausencia de corriente I_h provoca un marcado incremento de la cantidad de dopamina. A priori, estos resultados implicando a I_h en el bucle de retroalimentación negativo que controla la sobreproducción y/o sobre liberación de dopamina, podrían parecer contradictorios con los estudios realizados en rodajas de hipocampo de ratón o disociados de neuronas, donde bloquear la corriente I_h resulta en una disminución de la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas (Neuhoff et al., 2002; Puopolo et al., 2007). Sin embargo, hay varios factores que explican estas diferencias. En primer lugar, se ha demostrado que la corriente I_h puede facilitar o deprimir la respuesta de la célula postsináptica en función de la intensidad del estímulo, mediante interacción con la corriente I_m (George et al., 2009). En segundo lugar, la cinética de la corriente I_h depende de su localización subcelular (Revisado en Noam et al., 2011) y también de la isoforma expresada (Notomi and Shigemoto, 2004). Finalmente, todos estos trabajos se han realizado en rodajas o neuronas aisladas. Nosotros hemos analizado las consecuencias de eliminar la corriente I_h sobre los niveles de dopamina *in vivo*, en un organismo completo. Así, aunque en este trabajo hemos mostrado que, al igual que en mamíferos, el gen *Dmlh* se expresa en las células dopaminérgicas, nuestros resultados muestran la consecuencia final, sobre los niveles de dopamina, de eliminar la corriente I_h en todo el circuito implicado en su liberación, incluyendo las propias células dopaminérgicas y sus inputs directos o indirectos.

En resumen, podemos inferir de los datos que dos mecanismos diferentes operan para controlar los niveles de dopamina en luz y en oscuridad, siendo ambos dependientes, en mayor o menor medida, de la corriente I_h . En este punto no debemos olvidar que el propio gen *Dmlh* muestra variaciones en su expresión haciendo que la transcripción sea mayor al principio del día (ZT0) y menor al principio de la noche

(ZT12). Siguiendo este razonamiento, los defectos mostrados por los mutantes deberían ser más evidentes durante la fase de luz. Sin embargo, la compleja cinética del canal, y el hecho de que pueda ser modulado por AMPc, dificulta establecer una relación directa entre niveles de expresión y activación de la corriente *I_h*.

2. LOS NIVELES DE DOPAMINA INCREMENTADOS EN MUTANTES *DmIh* PODRIAN CONTRIBUIR A EXPLICAR LAS ALTERACIONES EN LA RITMICIDAD CIRCADIANA EN AUSENCIA DE ESTÍMULO AMBIENTAL (DD).

En condiciones de DD, los mutantes *DmIh* mostraron una pérdida de ritmicidad y, un acortamiento del periodo. Estas anomalías en el control circadiano, podrían ser una consecuencia de la pérdida de corriente *I_h* en el circuito del reloj desencadenante de la liberación del output final que dirige los ritmos locomotores. Sin embargo, la liberación de PDF en las terminaciones de las neuronas LNvs no muestra ninguna diferencia entre mutantes y control, sugiriendo que la alteración de los ritmos circadianos debe recaer en un punto de control downstream PDF. Además el hecho de que los mutantes muestren un patrón de locomoción durante DD en el que se mantiene la actividad elevada al inicio del día subjetivo refuerza el correcto funcionamiento de estas células, que constituyen el principal componente del “oscilador de mañana”, puesto que se ha demostrado que son necesarias para dirigir la locomoción en esta fase del día (Stoleru et al., 2004). Sin embargo, no podemos descartar un efecto de la corriente *I_h* en otros tipos celulares del reloj, puesto que la actividad en los mutantes, a diferencia de los controles, decae hacia el final del día subjetivo, sugiriendo alteraciones en el circuito del reloj responsable de este proceso, probablemente las neuronas encargadas del “oscilador de tarde”, concretamente neuronas LNds y la neurona LNv no PDF (Grima et al., 2004; Taghert and Shafer, 2006). Llegado este punto también es razonable considerar a la dopamina en este proceso, ya que las células TH envían proyecciones en la región de arborización de las células LNds. Además, se han descrito numerosas interacciones funcionales entre la dopamina y el reloj. En roedores, la activación del receptor de dopamina D2

provoca una activación de la transcripción de los genes del reloj (Suh and Jackson, 2007). Por otro lado, en la retina de vertebrados, se ha descrito un papel para la dopamina como regulador de la amplitud de las oscilaciones moleculares y en el reajuste de fase inducido por luz (Cahill and Besharse, 1991; Ruan et al., 2008).

En *Drosophila*, la pérdida de la actividad de la β -alanil-dopamina sintetasa en las células gliales (mutantes *ebony*), resulta en un incremento en los niveles de dopamina. Estos mutantes muestran un fenotipo en DD muy similar al de los mutantes nulos *Dmlh*, manteniendo un porcentaje de moscas rítmicas del 28%, con un acortamiento del periodo a 23,4 h. (Suh and Jackson, 2007). Sin embargo, no conlleva alteraciones del reloj central, por lo que proponen un modelo según el cual, la transcripción de *ebony*, estaría regulada por el reloj circadiano.

Del mismo modo, en rata, se ha descrito que alteraciones en los niveles de dopamina generan defectos en los ritmos de osciladores periféricos sin alterar los ritmos moleculares en el núcleo supraquiasmático (NSQ), que se traducen en un comportamiento locomotor arrítmico (Dibner et al., 2010). Por último, numerosos estudios han revelado la existencia de osciladores circadianos sensibles a metanfetamina, apoyando un papel para el sistema dopaminérgico como oscilador independiente del NSQ (Dibner et al., 2010).

Con todo, la dopamina emerge como un importante regulador de los relojes periféricos en mamíferos, un papel que podría estar conservado en *Drosophila*.

3. LA CONSOLIDACIÓN DEL SUEÑO REQUIERE UNA CORRECTA SEÑALIZACIÓN DOPAMINÉRGICA

Probablemente, la principal consecuencia de la alteración en los niveles de dopamina mostrada por los mutantes nulos *Dmlh*, es la aparición de fragmentación del sueño. Numerosos estudios han asociado la disminución de los niveles de dopamina con consolidación del sueño y viceversa (Van Swinderen and Andretic, 2011). De hecho, uno de los síntomas no motores en la enfermedad de Parkinson, es la

aparición de alteraciones en el sueño, que están asociadas a la terapia dopaminérgica (Park and Stacy, 2009).

Nuestros datos muestran que los elevados niveles de dopamina, que presentan los mutantes durante la noche, conllevan un marcado fenotipo de sueño fragmentado, que no es debido a envejecimiento. Pero además, durante el día, cuando los niveles de dopamina son similares entre individuos mutantes y control, también aparece fragmentación, por lo que no solo los niveles elevados de dopamina, sino también la pérdida de su correcta fluctuación provocan fallos en la consolidación del sueño.

El hecho de que disminuir farmacológicamente los niveles de dopamina mediante 3-iodotirosina (3IY) restaure la consolidación del sueño en mutantes, implica que éste fenotipo es dependiente de dopamina, y no provocado por otras alteraciones derivadas de la ausencia de corriente Ih.

Pero, además de la consolidación, todos los mutantes descritos con exceso o defecto de dopamina, tienen afectado el tiempo total de sueño (Andretic et al., 2005, 2008; Kume et al., 2005). Por el contrario, las moscas mutantes *Dmlh* no muestran alteraciones en la cantidad total de sueño, sugiriendo que esta diferencia recae directamente en la ausencia de corriente Ih. En vertebrados, la corriente Ih en las neuronas talamocorticales contribuye a promover la transición entre sueño y vigilia. Activar Ih resulta en la supresión del lento patrón de disparo en ráfagas, típico de la onda lenta de sueño, y en la activación de disparos tónicos, característicos del sueño REM o de la vigilia (Lee and McCormick, 1996). Además, la conductancia de Ih es potenciada por dopamina (Liu et al., 2003). En este escenario, es fácil entender como, cambios en la cantidad de dopamina, pueden provocar diferentes respuestas dependiendo de si la corriente Ih está o no presente. De hecho, en los mutantes nulos *Dmlh*, ni el incremento de dopamina (fase de noche en LD) ni la disminución de los niveles (tratamiento con 3IY), alteran los minutos totales que los individuos duermen. Estos resultados sugieren que, también en moscas, la dopamina afecta al tiempo total de sueño a través de la modulación de la corriente Ih.

4. EL PATRÓN DE LOCOMOCIÓN PARECE ESTAR ASOCIADO AL DE DOPAMINA EN *Drosophila*.

Numerosos estudios han implicado a la dopamina en la actividad siguiendo una relación directa según la cual incrementar los niveles de dopamina, resulta en un aumento de la locomoción (Zhou and Palmiter, 1995; Kume et al., 2005; Vermeulen et al., 2006; Draper et al., 2007). Pero además, parece existir una relación entre los patrones de dopamina y locomoción, ya que casi el 50% de los mutantes nulos para *Dmlh*, que han perdido la oscilación de los niveles de dopamina durante el día, dirigen un patrón de locomoción de meseta, mientras que casi la totalidad de los controles muestran patrones bimodales, tanto en niveles de dopamina, como en locomoción, aunque los picos de incremento de ambos patrones no son exactamente coincidentes. Esto puede explicarse por un estudio realizado por Lima et al., según el cual, la activación de las células que expresan TH, tiene un efecto opuesto sobre la actividad dependiendo del estado previo a la estimulación, de manera que la estimulación de las células dopaminérgicas aumenta la actividad en moscas adultas, excepto cuando las moscas ya mostraban una actividad elevada, en cuyo caso, la actividad tras la estimulación, disminuía (Lima and Miesenböck, 2005) De esta manera se propone que los cambios en los niveles de dopamina pueden actuar como un mecanismo de modulación de la actividad.

Sin embargo, el incremento sostenido de los niveles de dopamina en los mutantes *Dmlh* durante la fase de noche, resulta en un fenotipo de hiperactividad (mayor locomoción durante los episodios de actividad) en este periodo. Este fenotipo no parece ser un efecto independiente de dopamina, provocado por la ausencia de corriente *Ih* sobre la locomoción ya que, cuando se elimina esta corriente en motoneuronas, los individuos son hipoactivos (tanto adultos como larvas). Cuando se elimina la corriente en el músculo larvario solo cambia la morfología del terminal sin consecuencias en la actividad. Por tanto, parece plausible atribuir el aumento de locomoción durante la noche de los individuos *Dmlh*- al sistema nervioso central debido, probablemente al incremento de señalización dopaminérgica.

Sorprendentemente, la actividad total no es diferente en individuos control y mutantes durante la noche, ya que, estos últimos, incrementan el tiempo en que están inactivos cuando están despiertos (incluso respecto a los adultos con la mutación Ih^{DN} dirigida a motoneuronas). Estos resultados se confirman al analizar la locomoción larvaria donde los mutantes nulos *DmIh*, y no los mutantes dirigidos a motoneuronas o músculo, incrementan el número de paradas no asociadas a toma de decisiones o cambios de dirección. De manera que, de nuevo, nos encontramos frente a un fenotipo atribuible al sistema nervioso central. Sin embargo, eliminar neuronas utilizando el driver 4C-Gal4 (dirige expresión a, aproximadamente 200 neuronas, entre las cuales se encuentran dopaminérgicas y serotoninérgicas), no afecta a la duración de las paradas en larva de estadio III (Suster et al., 2003) sugiriendo que, la dopamina no parece modular este fenotipo en la locomoción. Diversos estudios han implicado directamente a la corriente Ih (mutaciones en los genes HCN) en el desarrollo de trastornos epilépticos (Postea and Biel, 2011), que podrían apuntar hacia la causa de las paradas de larga duración mostradas por los mutantes nulos *DmIh*.

5. LA CORRIENTE Ih PARECE TENER UN EFECTO EXCITATORIO EN LAS MOTONEURONAS

El efecto de la corriente Ih en la NMJ parece ser excitatorio, ya que, al bloquear la corriente mediante ZD7288, disminuye la amplitud de la respuesta del músculo. Las posibles compensaciones durante el desarrollo, tanto en mutantes nulos como dirigidos, impide observar diferencias importantes en la electrofisiología de la NMJ. Sin embargo, el hecho de que los individuos que expresan la isoforma Ih^{DN} en las motoneuronas (y en menor medida, en el mutante nulo *DmIh*), tengan menor contenido cuantál (Q, número de vesículas liberadas frente a un potencial evocado), sugiere que al eliminar la corriente Ih las motoneuronas son hipoexcitables. Siguiendo este razonamiento, el incremento de neurotransmisor en las vesículas (mayor amplitud de los potenciales postsinápticos miniatura) mostrado por ambos

mutantes podría formar parte de un mecanismo de compensación. Sin embargo, la confirmación de esta hipótesis requiere la realización de registros del axón.

A pesar de que el gen *Dmlh* se expresa en el músculo de larva III, no hemos conseguido registrar ningún efecto de la corriente en estas células más allá de defectos morfológicos. Si la corriente Ih fuera realmente requerida en el músculo solo durante el desarrollo, la pregunta a contestar es, por qué encontramos expresión en larva. Una posible explicación consiste en la posibilidad de mantener la expresión de *Dmlh* como un mecanismo de refuerzo, tal y como se ha descrito en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* de ratón donde, la corriente Ih está activa hasta las primeras semanas de la fase postnatal, hasta que es remplazada por corrientes de Ca^{2+} , momento a partir del cual el canal HCN se inactiva, aunque su expresión continúa como mecanismo de refuerzo (Chan et al., 2007).

Sin embargo, los mutantes nulos *Dmlh*, sí muestran una menor excitabilidad muscular (rápido decaimiento del EJP) que parece asociada a una menor contracción muscular, como se observa en el menor tamaño de la zancada en estos individuos. Sin embargo, el hecho de que ninguno de los mutantes dirigidos muestre este fenotipo sugiere que es desencadenado por la ausencia de Ih desde ambas células, pre y post-sináptica.

El acortamiento de la zancada en mutantes nulos se ve compensado por un incremento de la frecuencia de los ciclos de contracción, tal y como está descrito para otros mutantes de excitabilidad (Wang et al., 2002). La generación de los ritmos peristálticos que controlan la coordinación de la contracción entre los segmentos de la larva, se lleva a cabo en el sistema nervioso central y se ajusta a través del sistema sensorial, que informa del estado del músculo para promover al avance de la onda peristáltica. De este modo, se ha propuesto que, las neuronas sensoriales deben ser capaces de dirigir señales excitatorias e inhibitorias al sistema nervioso central a través de una interneurona inhibitoria que facilitara esta transición (Hughes and Thomas, 2007). Los resultados obtenidos en los mutantes que expresan Ih^{DN} bajo el

promotor D42G4 muestran un acortamiento del periodo de la zancada, que no es el resultado de un mecanismo compensatorio, puesto que estos individuos no muestran anomalías en la contracción. El promotor D42, además de en motoneuronas también de expresa en interneuronas (Parkes et al., 1998), lo que podría implicar un papel del canal Ih en el circuito encargado de enviar la información sensorial al sistema nervioso central.

Los resultados que hemos obtenido en este trabajo aportan un mayor conocimiento de la función de la corriente Ih en el sistema nervioso. Hemos demostrado por primera vez la oscilación de los niveles de dopamina en *Drosophila*, y como la corriente Ih está implicada en esta oscilación. Además hemos desvelado algunos comportamientos modulados por la corriente Ih, de manera que nuestros datos podrían ser considerados, no solo para el avance en el estudio de dianas farmacológicas para los canales HCN, sino también para el estudio de desordenes asociados a disfunción dopaminérgica.

CONCLUSIONES

1. El canal Ih se expresa en las células dopaminérgicas en *Drosophila*.
2. En *Drosophila*, la corriente Ih es necesaria para la correcta oscilación de la dopamina y para el mantenimiento de sus niveles fisiológicos, evitando una sobreproducción y/o sobre-liberación durante las fases de oscuridad.
3. La modulación de la duración total del sueño parece ser dependiente de la corriente Ih, sin embargo, la fragmentación del sueño mostrada por los mutantes nulos *Dmlh*, parece una consecuencia de la alteración en los niveles de dopamina.
4. La corriente Ih parece incrementar la excitabilidad en las motoneuronas y ser necesaria para la correcta locomoción. En el músculo, la corriente Ih parece intervenir en el correcto remodelamiento durante el desarrollo de la NMJ.
5. Alteraciones en la corriente Ih provocan anomalías circadianas, que parecen situarse downstream de PDF.

BIBLIOGRAFÍA

Andretic, R., and Hirsh, J. (2000). Circadian modulation of dopamine receptor responsiveness in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 1873–1878.

Andretic, R., Kim, Y.-C., Jones, F.S., Han, K.-A., and Greenspan, R.J. (2008). *Drosophila* D1 dopamine receptor mediates caffeine-induced arousal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 20392–20397.

Andretic, R., van Swinderen, B., and Greenspan, R.J. (2005). Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Curr Biol* *15*, 1165–1175.

Aponte, Y., Lien, C.-C., Reisinger, E., and Jonas, P. (2006). Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* *574*, 229–243.

Arencibia-Albite, F., Paladini, C., Williams, J.T., and Jiménez-Rivera, C.A. (2007). Noradrenergic modulation of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroscience* *149*, 303–314.

Bainton, R.J., Tsai, L.T., Singh, C.M., Moore, M.S., Neckameyer, W.S., and Heberlein, U. (2000). Dopamine modulates acute responses to cocaine, nicotine and ethanol in *Drosophila*. *Curr Biol* *10*, 187–194.

Barrow, A.J., and Wu, S.M. (2009). Low-Conductance HCN1 Ion Channels Augment the Frequency Response of Rod and Cone Photoreceptors. *The Journal of Neuroscience* *29*, 5841–5853.

Beaumont, V., and Zucker, R.S. (2000). Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic I_h channels. *Nat. Neurosci.* *3*, 133–141.

Beckstead, M.J., and Phillips, T.J. (2009). Mice selectively bred for high or low alcohol-induced locomotion exhibit differences in dopamine neuron function. *J Pharmacol Exp Ther.*

Borycz, J., Borycz, J.A., Kubów, A., Lloyd, V., and Meinertzhagen, I.A. (2008). *Drosophila* ABC transporter mutants white, brown and scarlet have altered contents

and distribution of biogenic amines in the brain. *J. Exp. Biol.* *211*, 3454–3466.

Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401–415.

Budnik, V. (1996). Synapse maturation and structural plasticity at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Curr. Opin. Neurobiol.* *6*, 858–867.

Budnik, V., Zhong, Y., and Wu, C.F. (1990). Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *J. Neurosci.* *10*, 3754–3768.

Cahill, G.M., and Besharse, J.C. (1991). Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors. *J. Neurosci.* *11*, 2959–2971.

Castañeda, T.R., de Prado, B.M., Prieto, D., and Mora, F. (2004). Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *J. Pineal Res* *36*, 177–185.

Cathala, L., and Paupardin-Tritsch, D. (1997). Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway. *J. Physiol. (Lond.)* *503* (Pt 1), 87–97.

Cathala, L., and Paupardin-Tritsch, D. (1999). Effect of catecholamines on the hyperpolarization-activated cationic I_h and the inwardly rectifying potassium I(Kir) currents in the rat substantia nigra pars compacta. *Eur. J. Neurosci.* *11*, 398–406.

Ceriani, M.F., Hogenesch, J.B., Yanovsky, M., Panda, S., Straume, M., and Kay, S.A. (2002). Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. *J Neurosci* *22*, 9305–9319.

Cervetto, L., Demontis, G.C., and Gargini, C. (2007). Cellular mechanisms underlying the pharmacological induction of phosphenes. *Br. J. Pharmacol.* *150*, 383–390.

Chan, C.S., Guzman, J.N., Ilijic, E., Mercer, J.N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G.E., and Surmeier, D.J. (2007). “Rejuvenation” protects neurons in mouse models of Parkinson’s disease. *Nature* *447*, 1081–1086.

Chu, H., and Zhen, X. (2010). Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the regulation of midbrain dopamine systems. *Acta Pharmacol. Sin.* *31*, 1036–1043.

- Cirelli, C. (2009). The genetic and molecular regulation of sleep: from fruit flies to humans. *Nat. Rev. Neurosci* *10*, 549–560.
- Cirelli, C., Bushey, D., Hill, S., Huber, R., Kreber, R., Ganetzky, B., and Tononi, G. (2005). Reduced sleep in *Drosophila* Shaker mutants. *Nature* *434*, 1087–1092.
- Collins, C.A., and DiAntonio, A. (2007). Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 35–42.
- Dibner, C., Schibler, U., and Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 517–549.
- Draper, I., Kurshan, P.T., McBride, E., Jackson, F.R., and Kopin, A.S. (2007). Locomotor activity is regulated by D2-like receptors in *Drosophila*: an anatomic and functional analysis. *Dev Neurobiol* *67*, 378–393.
- Featherstone, D.E., and Broadie, K. (2000). Surprises from *Drosophila*: genetic mechanisms of synaptic development and plasticity. *Brain Res. Bull.* *53*, 501–511.
- Fernández, M. de la P., Chu, J., Vilella, A., Atkinson, N., Kay, S.A., and Ceriani, M.F. (2007). Impaired clock output by altered connectivity in the circadian network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 5650–5655.
- Fernández, M.P., Berni, J., and Ceriani, M.F. (2008). Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. *PLoS Biol.* *6*, e69.
- Frisch, B., Hardin, P.E., Hamblen-Coyle, M.J., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1994). A promoterless period gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical per expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. *Neuron* *12*, 555–570.
- Ganetzky, B., and Wu, C.F. (1983). Neurogenetic analysis of potassium currents in *Drosophila*: synergistic effects on neuromuscular transmission in double mutants. *J. Neurogenet.* *1*, 17–28.
- George, M.S., Abbott, L.F., and Siegelbaum, S.A. (2009). HCN hyperpolarization-activated cation channels inhibit EPSPs by interactions with M-type K(+) channels. *Nat. Neurosci.* *12*, 577–584.
- Gisselmann, G., Gamerschlag, B., Sonnenfeld, R., Marx, T., Neuhaus, E.M., Wetzel, C.H., and Hatt, H. (2005). Variants of the *Drosophila melanogaster* Ih-channel are generated by different splicing. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *35*, 505–514.

- Goodman, C.S., and Shatz, C.J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72 *Suppl*, 77–98.
- Gramates, L.S., and Budnik, V. (1999). Assembly and maturation of the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Int. Rev. Neurobiol.* 43, 93–117.
- Gravotta, L., Gavrila, A.M., Hood, S., and Amir, S. (2011). Global depletion of dopamine using intracerebroventricular 6-hydroxydopamine injection disrupts normal circadian wheel-running patterns and PERIOD2 expression in the rat forebrain. *J. Mol. Neurosci.* 45, 162–171.
- Grima, B., Chélot, E., Xia, R., and Rouyer, F. (2004). Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* 431, 869–873.
- Hamasaka, Y., and Nässel, D.R. (2006). Mapping of serotonin, dopamine, and histamine in relation to different clock neurons in the brain of *Drosophila*. *J Comp Neurol* 494, 314–330.
- Harbison, S.T., Mackay, T.F.C., and Anholt, R.R.H. (2009). Understanding the neurogenetics of sleep: progress from *Drosophila*. *Trends Genet.* 25, 262–269.
- Hardie, S.L., and Hirsh, J. (2006). An improved method for the separation and detection of biogenic amines in adult *Drosophila* brain extracts by high performance liquid chromatography. *J Neurosci Methods* 153, 243–249.
- Helfrich-Förster, C. (1998). Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. *J. Comp. Physiol. A* 182, 435–453.
- Helfrich-Förster, C., Shafer, O.T., Wülbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D., and Taghert, P. (2007). Development and morphology of the clock-gene-expressing lateral neurons of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 500, 47–70.
- Hendricks, J.C., Finn, S.M., Panckeri, K.A., Chavkin, J., Williams, J.A., Sehgal, A., and Pack, A.I. (2000). Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron* 25, 129–138.
- Hendricks, J.C., Lu, S., Kume, K., Yin, J.C.P., Yang, Z., and Sehgal, A. (2003). Gender dimorphism in the role of cycle (BMAL1) in rest, rest regulation, and longevity in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms* 18, 12–25.
- Hirsh, J., Riemensperger, T., Coulom, H., Iché, M., Coupar, J., and Birman, S. (2010). Roles of dopamine in circadian rhythmicity and extreme light sensitivity of circadian entrainment. *Curr. Biol.* 20, 209–214.

- HODGKIN, A.L., and HUXLEY, A.F. (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* *116*, 449–472.
- Hood, S., Cassidy, P., Cossette, M.-P., Weigl, Y., Verwey, M., Robinson, B., Stewart, J., and Amir, S. (2010). Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. *J. Neurosci.* *30*, 14046–14058.
- Huang, Z., Lujan, R., Kadurin, I., Uebele, V.N., Renger, J.J., Dolphin, A.C., and Shah, M.M. (2011). Presynaptic HCN1 channels regulate Cav3.2 activity and neurotransmission at select cortical synapses. *Nat. Neurosci.* *14*, 478–486.
- Hughes, C.L., and Thomas, J.B. (2007). A sensory feedback circuit coordinates muscle activity in *Drosophila*. *Mol. Cell. Neurosci.* *35*, 383–396.
- Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1976). Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J. Physiol. (Lond.)* *262*, 189–214.
- Johansen, J., Halpern, M.E., and Keshishian, H. (1989). Axonal guidance and the development of muscle fiber-specific innervation in *Drosophila* embryos. *J. Neurosci.* *9*, 4318–4332.
- Kalidas, S., and Smith, D.P. (2002). Novel genomic cDNA hybrids produce effective RNA interference in adult *Drosophila*. *Neuron* *33*, 177–184.
- Keegan, K.P., Pradhan, S., Wang, J.-P., and Allada, R. (2007). Meta-analysis of *Drosophila* circadian microarray studies identifies a novel set of rhythmically expressed genes. *PLoS Comput. Biol.* *3*, e208.
- Koh, K., Evans, J.M., Hendricks, J.C., and Sehgal, A. (2006). A *Drosophila* model for age-associated changes in sleep:wake cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 13843–13847.
- Kume, K., Kume, S., Park, S.K., Hirsh, J., and Jackson, F.R. (2005). Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J. Neurosci.* *25*, 7377–7384.
- Lebestky, T., Chang, J.-S.C., Dankert, H., Zelnik, L., Kim, Y.-C., Han, K.-A., Wolf, F.W., Perona, P., and Anderson, D.J. (2009). Two different forms of arousal in *Drosophila* are oppositely regulated by the dopamine D1 receptor ortholog DopR via distinct neural circuits. *Neuron* *64*, 522–536.
- Lee, K.H., and McCormick, D.A. (1996). Abolition of spindle oscillations by serotonin and norepinephrine in the ferret lateral geniculate and perigeniculate nuclei

in vitro. *Neuron* 17, 309–321.

Lima, S.Q., and Miesenböck, G. (2005). Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons. *Cell* 121, 141–152.

Liu, Z., Bunney, E.B., Appel, S.B., and Brodie, M.S. (2003). Serotonin reduces the hyperpolarization-activated current (I_h) in ventral tegmental area dopamine neurons: involvement of 5-HT₂ receptors and protein kinase C. *J. Neurophysiol* 90, 3201–3212.

Lnenicka, G.A., Spencer, G.M., and Keshishian, H. (2003). Effect of reduced impulse activity on the development of identified motor terminals in *Drosophila* larvae. *J. Neurobiol.* 54, 337–345.

Magee, J.C. (1999). Dendritic I_h normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat. Neurosci.* 2, 508–514.

Mao, Z., and Davis, R.L. (2009). Eight different types of dopaminergic neurons innervate the *Drosophila* mushroom body neuropil: anatomical and physiological heterogeneity. *Front Neural Circuits* 3, 5.

Marx, T., Gisselmann, G., Störtkuhl, K.F., Hovemann, B.T., and Hatt, H. (1999). Molecular cloning of a putative voltage- and cyclic nucleotide-gated ion channel present in the antennae and eyes of *Drosophila melanogaster*. *Invert. Neurosci.* 4, 55–63.

Meldrum, B.S., and Rogawski, M.A. (2007). Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics* 4, 18–61.

Meredith, A.L., Wiler, S.W., Miller, B.H., Takahashi, J.S., Fodor, A.A., Ruby, N.F., and Aldrich, R.W. (2006). BK calcium-activated potassium channels regulate circadian behavioral rhythms and pacemaker output. *Nat. Neurosci.* 9, 1041–1049.

Monastirioti, M. (1999). Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microsc. Res. Tech.* 45, 106–121.

Monier, B., Astier, M., Sémériva, M., and Perrin, L. (2005). Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart. *Development* 132, 5283–5293.

Neuhoff, H., Neu, A., Liss, B., and Roeper, J. (2002). I_h channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J. Neurosci* 22, 1290–1302.

- Nitabach, M.N., Wu, Y., Sheeba, V., Lemon, W.C., Strumbos, J., Zelensky, P.K., White, B.H., and Holmes, T.C. (2006). Electrical hyperexcitation of lateral ventral pacemaker neurons desynchronizes downstream circadian oscillators in the fly circadian circuit and induces multiple behavioral periods. *J. Neurosci.* *26*, 479–489.
- Noam, Y., Bernard, C., and Baram, T.Z. (2011). Towards an integrated view of HCN channel role in epilepsy. *Curr. Opin. Neurobiol.* *21*, 873–879.
- Notomi, T., and Shigemoto, R. (2004). Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* *471*, 241–276.
- Parisky, K.M., Agosto, J., Pulver, S.R., Shang, Y., Kuklin, E., Hodge, J.J.L., Kang, K., Kang, K., Liu, X., Garrity, P.A., et al. (2008). PDF cells are a GABA-responsive wake-promoting component of the *Drosophila* sleep circuit. *Neuron* *60*, 672–682.
- Park, A., and Stacy, M. (2009). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *J. Neurol.* *256 Suppl 3*, 293–298.
- Parkes, T.L., Elia, A.J., Dickinson, D., Hilliker, A.J., Phillips, J.P., and Boulianne, G.L. (1998). Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nat. Genet.* *19*, 171–174.
- Peron, S., Zordan, M.A., Magnabosco, A., Reggiani, C., and Megighian, A. (2009). From action potential to contraction: Neural control and excitation-contraction coupling in larval muscles of *Drosophila*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.*
- Postea, O., and Biel, M. (2011). Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov* *10*, 903–914.
- Puopolo, M., Raviola, E., and Bean, B.P. (2007). Roles of subthreshold calcium current and sodium current in spontaneous firing of mouse midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci* *27*, 645–656.
- Renn, S.C., Park, J.H., Rosbash, M., Hall, J.C., and 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*, 791–802.
- Riemensperger, T., Isabel, G., Coulom, H., Neuser, K., Seugnet, L., Kume, K., Iché-Torres, M., Cassar, M., Strauss, R., Preat, T., et al. (2011). Behavioral consequences of dopamine deficiency in the *Drosophila* central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 834–839.
- Rohrbough, J., Grotewiel, M.S., Davis, R.L., and Broadie, K. (2000). Integrin-

- mediated regulation of synaptic morphology, transmission, and plasticity. *J. Neurosci.* *20*, 6868–6878.
- Ruan, G.-X., Allen, G.C., Yamazaki, S., and McMahon, D.G. (2008). An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol* *6*, e249.
- Sanchez, D., López-Arias, B., Torroja, L., Canal, I., Wang, X., Bastiani, M.J., and Ganfornina, M.D. (2006). Loss of glial lazarus, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *16*, 680–686.
- Shafer, O.T., Helfrich-Förster, C., Renn, S.C.P., and Taghert, P.H. (2006). Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *J. Comp. Neurol.* *498*, 180–193.
- Shang, Y., Griffith, L.C., and Rosbash, M. (2008). Light-arousal and circadian photoreception circuits intersect at the large PDF cells of the *Drosophila* brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 19587–19594.
- Shang, Y., Haynes, P., Pérez, N., Harrington, K.I., Guo, F., Pollack, J., Hong, P., Griffith, L.C., and Rosbash, M. (2011). Imaging analysis of clock neurons reveals light buffers the wake-promoting effect of dopamine. *Nat. Neurosci.* *14*, 889–895.
- Shaw, P.J., Cirelli, C., Greenspan, R.J., and Tononi, G. (2000). Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* *287*, 1834–1837.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., and Waterhouse, P.M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* *407*, 319–320.
- Sorribes, A., Armendariz, B.G., Lopez-Pigozzi, D., Murga, C., and de Polavieja, G.G. (2011). The origin of behavioral bursts in decision-making circuitry. *PLoS Comput. Biol.* *7*, e1002075.
- Stewart, B.A., Atwood, H.L., Renger, J.J., Wang, J., and Wu, C.F. (1994). Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *J. Comp. Physiol. A* *175*, 179–191.
- Suh, J., and Jackson, F.R. (2007). *Drosophila* ebony activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. *Neuron* *55*, 435–447.
- Suster, M.L., Martin, J.-R., Sung, C., and Robinow, S. (2003). Targeted expression of tetanus toxin reveals sets of neurons involved in larval locomotion in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* *55*, 233–246.

- Van Swinderen, B., and Andretic, R. (2011). Dopamine in *Drosophila*: setting arousal thresholds in a miniature brain. *Proc. Biol. Sci.* 278, 906–913.
- Taghert, P.H., and Shafer, O.T. (2006). Mechanisms of clock output in the *Drosophila* circadian pacemaker system. *J. Biol. Rhythms* 21, 445–457.
- Ueda, A., and Wu, C.-F. (2006). Distinct frequency-dependent regulation of nerve terminal excitability and synaptic transmission by IA and IK potassium channels revealed by *Drosophila* Shaker and Shab mutations. *J. Neurosci.* 26, 6238–6248.
- Vandecasteele, M., Glowinski, J., Deniau, J.-M., and Venance, L. (2008). Chemical transmission between dopaminergic neuron pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4904–4909.
- Vermeulen, C.J., Cremers, T.I.F.H., Westerink, B.H.C., Van De Zande, L., and Bijlsma, R. (2006). Changes in dopamine levels and locomotor activity in response to selection on virgin lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev* 127, 610–617.
- Wang, J.W., Soll, D.R., and Wu, C.-F. (2002). Morphometric description of the wandering behavior in *Drosophila* larvae: a phenotypic analysis of K⁺ channel mutants. *J. Neurogenet.* 16, 45–63.
- Wang, J.W., Sylwester, A.W., Reed, D., Wu, D.A., Soll, D.R., and Wu, C.F. (1997). Morphometric description of the wandering behavior in *Drosophila* larvae: aberrant locomotion in Na⁺ and K⁺ channel mutants revealed by computer-assisted motion analysis. *J. Neurogenet.* 11, 231–254.
- Wegener, C., Hamasaka, Y., and Nässel, D.R. (2004). Acetylcholine increases intracellular Ca²⁺ via nicotinic receptors in cultured PDF-containing clock neurons of *Drosophila*. *J. Neurophysiol.* 91, 912–923.
- Xue, T., Marbán, E., and Li, R.A. (2002). Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization. *Circ. Res.* 90, 1267–1273.
- Yang, Z., and Sehgal, A. (2001). Role of Molecular Oscillations in Generating Behavioral Rhythms in *Drosophila*. *Neuron* 29, 453–467.
- Zagotta, W.N., and Siegelbaum, S.A. (1996). Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 235–263.
- Zhang, Y., Oliva, R., Gisselmann, G., Hatt, H., Guckenheimer, J., and Harris-Warrick, R.M. (2003). Overexpression of a hyperpolarization-activated cation

current (I_h) channel gene modifies the firing activity of identified motor neurons in a small neural network. *J. Neurosci.* 23, 9059–9067.

Zhou, Q.Y., and Palmiter, R.D. (1995). Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* 83, 1197–1209.

ANEXO

Tabla 1. Comparación de la oscilación de dopamina en LD vs DD, en moscas control.

Para analizar el efecto del tiempo circadiano (ZT/CT) y la condición de luz (LD o DD) se realizó un análisis ANOVA de dos factores. Ambos factores, y su interacción, fueron significativos ($F_{13,42}=4.760$; $p<0.001$), implicando que la dopamina oscila a lo largo de 24 horas de manera diferencial en LD y DD.

Source of variability	d.f.	MS	F	p
LD-DD	1	50.104	5.985	0.019
ZT/CT	6	51.133	6.108	<0.001
LD-DD x ZT/CT	6	26.854	3.208	0.011
Error	42	8.371		
	$R^2 = 0.596$			

Tabla 2. Efecto de la mutación Dmlh sobre la oscilación de dopamina en LD y DD.

Para analizar el efecto del genotipo (control o mutantes Dmlh) y el tiempo circadiano (ZT/CT) se realizó ANOVA de dos factores en ambas condiciones LD y DD.

En LD, tanto el genotipo como el ZT, tienen un efecto significativo sobre los niveles de dopamina, indicando que la dopamina oscila en ambos genotipos. Sin embargo esta oscilación es distinta entre individuos mutantes Dmlh y controles, puesto que la interacción entre ZT y genotipo es significativa.

En DD, tanto el genotipo como el CT, afectan a los niveles de dopamina, aunque los cambios diarios no son diferentes entre controles y mutantes puesto que la interacción entre ambos factores no es significativa.

Source	LD				DD			
	d.f.	MS	F	p	d.f.	MS	F	p
Genotipo	1	77.574	11.250	0.002	1	704.392	67.764	<0.001
ZT/CT	6	47.867	6.942	<0.001	6	32.261	3.104	0.013
Genotipo x ZT/CT	6	55.056	7.985	<0.001	6	6.822	0.656	0.685
Error	42	6.895			42	10.395		
	$R^2 = 0.706$				$R^2 = 0.683$			