



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO

Estudio del efecto de la interacción genético-nutricional prenatal sobre los patrones de sueño de *Drosophila melanogaster*

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN GENÉTICA

AUTOR: Nolberto Zúñiga Contreras

TUTORES: Patricio Olguín Aguilera
Ricardo Verdugo Salgado

2017

Lugar de Realización

Laboratorio de Genética del Desarrollo de *Drosophila*, Programa de Genética Humana, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Financiamiento

Proyecto Anillo ACT 1401

Índice General

Índice General	i
Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tablas.....	iv
Anexos	v
Abreviaturas.....	v
Resumen	i
Abstract	2
Introducción.....	3
Variación fenotípica de los patrones del sueño.....	14
Nutrición y Sueño.....	18
Hipótesis.....	24
Objetivos	25
Objetivo General	25
Objetivos Específicos.....	25
Materiales y métodos	26
Unidad de observación	26
Criterios de selección.....	26
The Drosophila melanogaster Genetic Reference Panel (DGRP).....	26
Consideraciones éticas.....	27

Tamaño muestral	27
Técnicas y métodos utilizados	28
Dieta.....	28
Tabla 3 Receta para dieta estándar o control por un Litro	28
Protocolo de obtención de individuos.	28
Cuantificación de fenotipos.....	29
Fenotipos Evaluados.....	30
Análisis Estadístico	31
Resultados	35
1. Establecer un protocolo de restricción nutricional prenatal y observar su efecto en el desarrollo y viabilidad de un grupo de líneas isogénicas del DGRP.	35
2. Evaluar los patrones del sueño de individuos adultos en un grupo de líneas isogénicas del DGRP con y sin restricción nutricional prenatal.....	37
3. Determinar efectos genéticos, nutricionales y de interacción en patrones de sueño entre las distintas líneas DGRP.....	45
Discusión.....	51
Conclusiones.....	56
Anexos	57
Anexo 1	57
Anexo 2:.....	57
Bibliografía	58

Índice de Figuras

Figura 1: Posibles funciones de sueño en <i>Drosophila melanogaster</i>	4
Figura 2. Representación de estructuras del SNC que regulan el sueño y excitación en <i>Drosophila melanogaster</i> . La ilustración representa un corte rostral de un cerebro adulto de <i>D. melanogaster</i>	6
Figura 3. Organización del circuito de sueño dependiendo de la hora del día.....	7
Figura 4. Sueño en <i>Drosophila melanogaster</i>	10
Figura 5. Sueño según edad en <i>Drosophila melanogaster</i>	11
Figura 6. Variación Fenotípica de Patrones del Sueño en <i>Drosophila</i>	15-16
Figura 7. Influencia del genotipo sobre la variabilidad individual en la duración del sueño.....	17
Figura 8: Plasticidad del desarrollo del lóbulo óptico de <i>Drosophila melanogaster</i> de larvas sometidas a restricción nutricional.....	20
Figura 9: Las poblaciones de moscas duermen mejor con comida completa.....	21-22
Figura 10. Sistema DAMs Trikinetics.....	29
Figura 11. Tiempo de desarrollo en días de individuos de <i>Drosophila melanogaster</i> en comida normal y 3 diluciones (0.5x, 0.2x 0.1x).....	36
Figura 12: Perfiles de sueño y actividad para 20 líneas DGRP.....	39
Figura 13: La restricción de nutrientes modifica los fenotipos de sueño diferencialmente entre hembras y machos adultos de líneas isogénicas de <i>Drosophila melanogaster</i>	43-44
Figura 14: La disminución del sueño total en algunas líneas, se explica principalmente por el aumento en el número de episodios de sueño y a la disminución del tiempo de latencia en hembras y machos adultos de líneas isogénicas de <i>Drosophila melanogaster</i>	44

Índice de Tablas.

Tabla 1: Genes involucrados en la regulación del ciclo circadiano. Genes humanos y sus homólogos en <i>Drosophila melanogaster</i>	12
Tabla 2: Genes involucrados en la regulación de sueño. Genes humanos y sus homólogos en <i>Drosophila melanogaster</i> . Modificado de Harbison et al. (2013).....	13
Tabla 3 Receta para dieta estándar o control por un Litro.....	28
Tabla 4. Tabla ANOVA, en la cual se muestran las esperanzas de los cuadrados medios para el Modelo 2.....	33
Tabla 5: Protocolos de dilución de dieta control.....	35
Tabla 6: Variación fenotípica debido al genotipo en los patrones del sueño en hembras y machos adultos de <i>Drosophila melanogaster</i> en ambas dietas. En negrita se muestran los valores significativos.....	38
Tabla 7: Promedios por fenotipo y valores de significancia de los efectos marginales de cada factor del modelo estadístico 1. En negrita se muestran los valores significativos.....	46
Tabla 8: Significancia de efectos de interacción entre línea, sexo y dieta para 9 fenotipos de sueño en 20 líneas isogénicas DGRP. En negrita se muestran los valores significativos.....	47
Tabla 9. Valores de varianza para los factores del Modelo estadístico 2 por cada fenotipo en Machos.....	48
Tabla 10: Valores de varianza para los factores del Modelo estadístico 2 por cada fenotipo en Hembras.....	49
Tabla 11: Heredabilidad en sentido amplio e índice de interacción genético-ambiental para fenotipos del sueño de 10 líneas isogénicas sometidas a restricción nutricionales prenatal.....	50

Anexos

Anexo 1.....57

Anexo 2.....57

Abreviaturas

Fig.: Figura

SNC: Sistema Nervioso Central

MB: Mushroom Body

FB: Fan-Shapped Body

EB: Ellipsoid Body

PPL1/PPM3 DA: Neuronas dopaminérgicas

PI: Pars Intercerebralis

I-LNv/s-LNv: Neuronas ventrales laterales, largas y cortas

ExFI2: Neuronas laterales tipo F

DGRP: Drosophila Genetic Reference Panel

NE: Neuroepitelio

RN: Restricción Nutricional

ZT: Tiempo Zeitgeber

DAMs: *Drosophila* Activity Monitoring System

NESD: Número de Episodios de Sueño Diurno

NESN: Número de Episodios de Sueño Nocturno

PESD: Duración Promedio de Episodios de Sueño Diurno

PESN: Duración Promedio de Episodios de Sueño Nocturno

SSD: Suma de los cuadrados por Dieta

SSL: Suma de cuadrados entre líneas

SSS: Suma de cuadrados entre sexos

SSE: Suma de los cuadrados del error

M.S: Cuadrados medios

E(M.S): Esperanza de cuadrados medios

LxD: Interacción entre Línea y Dieta

LxS: Interacción entre Línea y Sexo

DxS: Interacción entre Dieta y Sexo

LxDxS: Interacción entre Línea, Dieta y Sexo.

H^2 : Heradabilidad en sentido amplio

I^2 : Índice de la varianza debida a interacción genético-ambiental

DA: Dopamina

OA: Octopamina

5-HT: Serotonina

Resumen

El sueño es una característica presente en gran parte de los animales, necesario para la consolidación de la memoria y la regulación de los ciclos hormonales. En *Drosophila melanogaster*, el control del sueño ocurre de manera similar al humano, existiendo genes ortólogos que controlan este comportamiento entre ambas especies. Existe una variación fenotípica de los patrones de sueño dentro de la población que es principalmente explicada por el distinto fondo genético de los individuos, y que además se ven afectados por cambios en el ambiente, revelando una interacción entre el genotipo y la dieta.

El desarrollo del SNC de *Drosophila melanogaster* durante el período larvario se puede dividir en las etapas proliferativa y neurogénica. La etapa proliferativa, es sensible a los cambios nutricionales, por lo que una restricción nutricional prenatal, afecta el número de células madres neurales disponibles, pudiendo afectar la morfología de las estructuras y por lo tanto los comportamientos controlados por ellas en el individuo adulto.

Nuestros resultados muestran que existe una variación fenotípica en los patrones de sueño tanto en los individuos que se desarrollan en dieta normal como en restricción nutricional prenatal. Además, existen diferencias significativas entre los individuos por efecto de la dieta en sueño total, sueño nocturno, actividad, duración promedio de episodios de sueño nocturno y latencia. Además, existe dimorfismo sexual en todos los fenotipos analizados, excepto duración promedio de episodios de sueño nocturno. En esta tesis se demostró que existen diferencias en un panel de líneas isogénicas en respuesta a la restricción alimentaria, evidenciando un efecto de interacción entre el genotipo y la dieta que explica hasta un 15% de la varianza fenotípica.

Abstract

Sleep is a behavior broadly distributed in animals and is necessary for memory consolidation and hormonal cycle regulation. In *Drosophila melanogaster* and humans, sleeping is controlled by orthologue genes. The phenotypic variation of sleep patterns is affected by the different genetic backgrounds of each individual and by environmental changes, revealing the interaction between genotype and diet.

Development of the SNC of *Drosophila melanogaster* during larval stage can be divided in a proliferative stage and a neurogenic stage. The proliferative stage is sensitive to nutritional changes; consequently, pre-natal undernourishment diminishes the pool of neural stem cells, affecting the morphology of brain structures and, concomitantly, the different behaviors controlled by these structures.

Our results show that there is a phenotypic variation in the sleeping patterns in both, individuals that developed in a control diet and the ones subjected to pre-natal undernourishment. Additionally, there are significant differences between everyone, due to the effect of the diet, in total sleep, nocturnal sleep, activity, night average bout length and latency. Furthermore, each analyzed phenotype shows sexual dimorphism, except night average bout length. This thesis shows that there are significant differences in sleeping parameters in an isogenic *Drosophila* reference panel in response to dietary restriction, revealing the interaction between genotype and diet, showing that for nocturnal sleep, up to a 15% of the phenotypic variance can be explained by the genotype-diet interaction

Introducción

El dormir es una conducta necesaria que está presente en todo el reino animal y es variable inter- e intra-especies (Pack and Pien 2011). El sueño tiene funciones de carácter fisiológico, que incluyen la consolidación de memoria y regulación de ciclos hormonales (Cirelli and Tononi 2008). En *Drosophila melanogaster* también se han descrito estas funciones y los genes y moléculas asociadas a ello (Fig. 1) (Potdar and Sheeba 2013).

Las alteraciones del sueño se producen por diversas causas y tienen un alto impacto en la salud humana. Individuos con narcolepsia pueden experimentar pérdida de control muscular y alucinaciones, interfiriendo la actividad diaria (Sehgal and Mignot 2011). El síndrome de piernas inquietas y la apnea obstructiva del sueño causan somnolencia diurna y una disminución del desempeño cognitivo (Breslau *et al.* 1996; Liu *et al.* 2015). Sueño pobre y desórdenes del sueño son factores de riesgo para otras patologías, tales como, obesidad, presión alta, patologías cardiovasculares y depresión (Breslau *et al.* 1996; Cirelli and Tononi 2008; Liu *et al.* 2015)

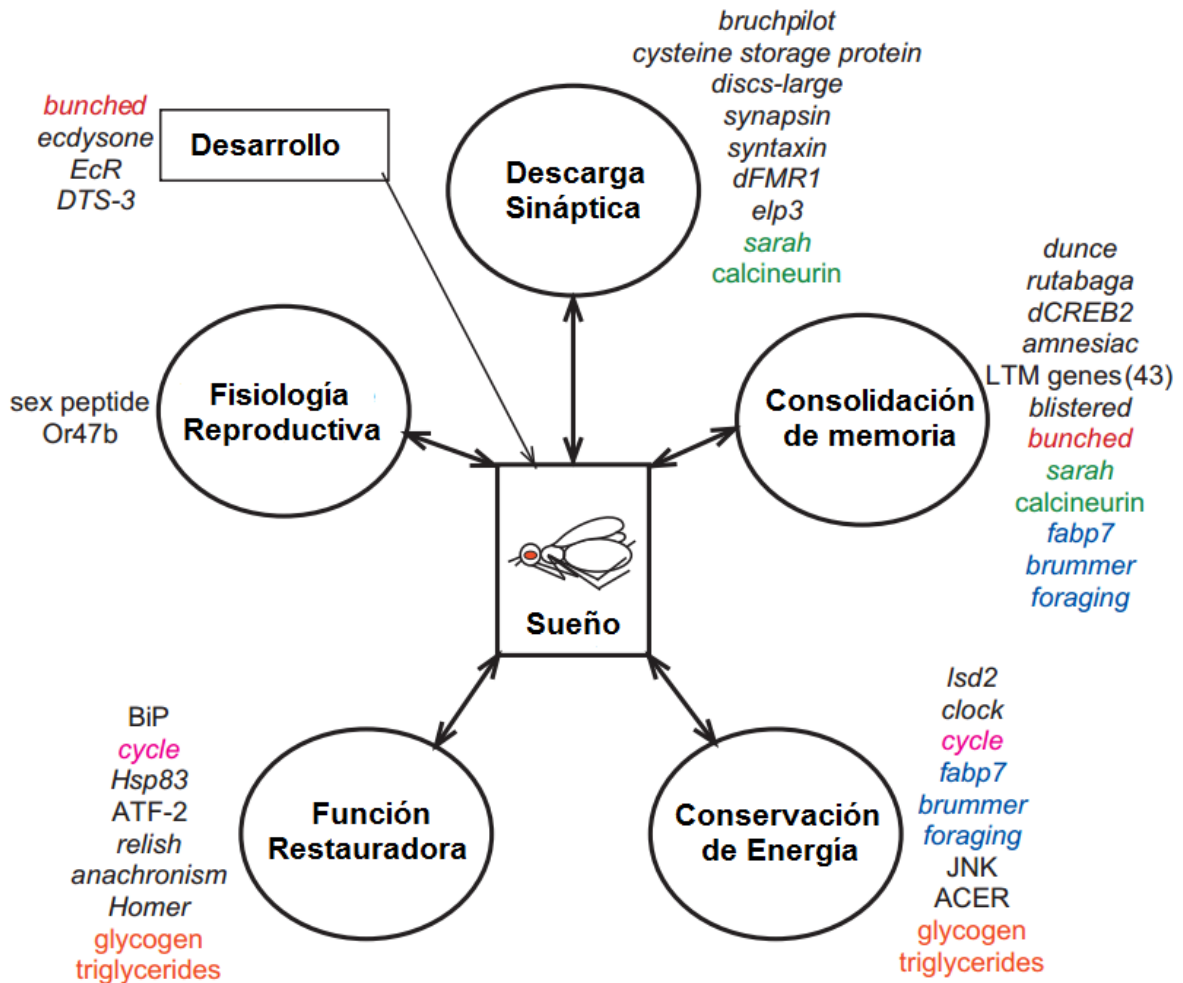


Figura 1: Posibles funciones de sueño en *Drosophila melanogaster*. Se ha descrito que el sueño en *Drosophila* está involucrado en funciones de descarga sináptica, consolidación de memoria, conservación de energía, función restauradora y fisiología reproductiva. Las moléculas involucradas en cada proceso están al lado de cada función, las que poseen el mismo color están involucradas en más de un proceso. Las flechas en ambos sentidos, muestra que ambos procesos pueden ser la causa y efecto de alguna alteración fisiológica. Alteraciones durante el desarrollo tiene un efecto en el sueño durante la etapa adulta de *Drosophila*. Modificado de (Potdar and Sheeba 2013).

En humanos y en *Drosophila melanogaster*, se han descrito una serie de fenotipos asociados al sueño, que hacen referencia a una serie de variables cuantificables, caracterizando el sueño en un individuo. Estos son duración del sueño, número de episodios de sueño, duración promedio de episodios de sueño, actividad y tiempo requerido para dormirse (Harbison *et al.* 2013). Todos estos patrones están regulados e insertos en el denominado ciclo circadiano, el cual es un ciclo biológico que regula las funciones fisiológicas diarias de un individuo. En humanos y en *Drosophila* la duración de este ciclo es de aproximadamente 24 horas (24,18 hrs) (Young 2004). Este ritmo biológico está controlado en el núcleo supraquiasmático cerebral, donde cada célula expresa genes encargados de regular este ciclo (Young 2004) activando una vía de señalización mediada por TGF α y ErbB-1 (Foltenyi *et al.* 2007). En *Drosophila*, un tiempo mayor a 5 minutos de inactividad está definido como sueño (Shaw and Cirelli 2000). En esta especie, el sueño está controlado por diferentes vías de señalización en las que participan neuronas del par intercerebralis, mushroom bodies, fan-shaped body y tritocerebro (Potdar and Sheeba 2013), siendo mediado por monoaminas, octopamina, GABA y ErbB-1 (Foltenyi *et al.* 2007; Masek and Keene 2012; Ueno *et al.* 2012; Potdar and Sheeba 2013) (Fig. 2) (Fig 3.).

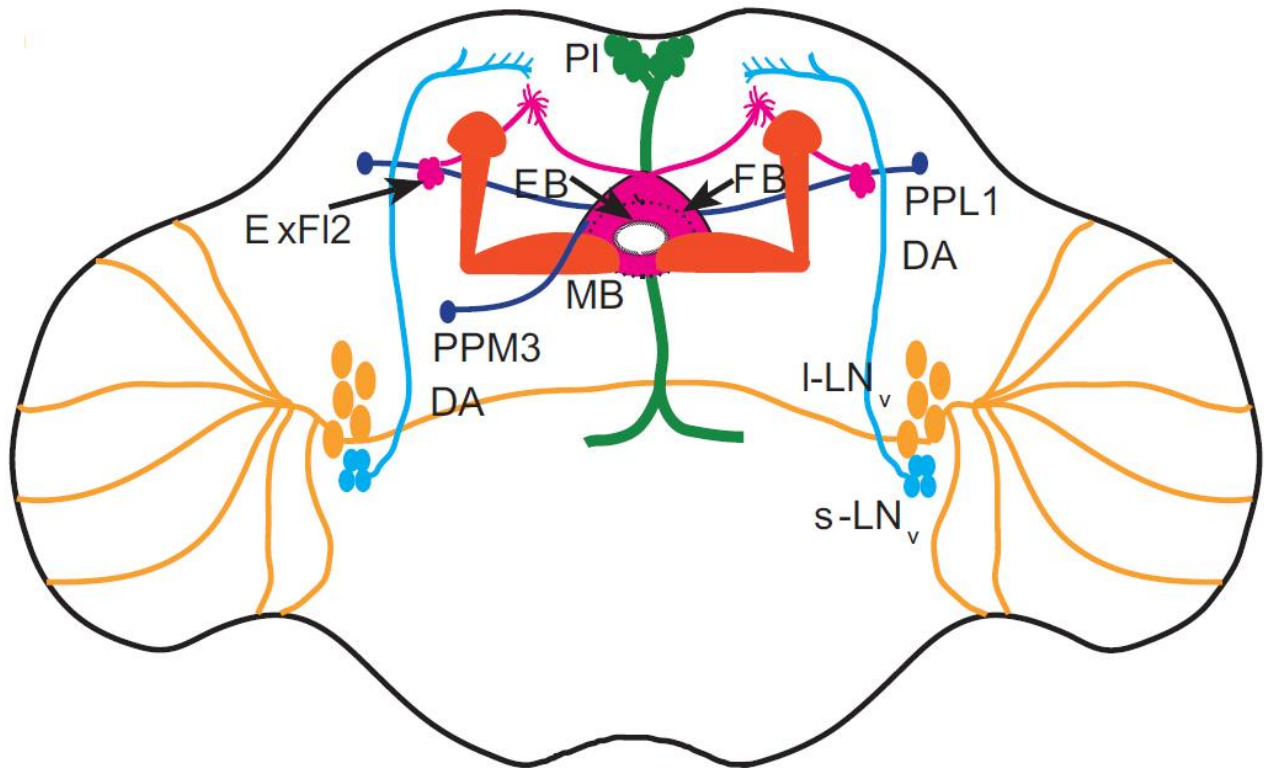


Figura 2. Representación de estructuras del SNC que regulan el sueño y excitación en *Drosophila melanogaster*. La ilustración representa un corte rostral de un cerebro adulto de *D. melanogaster*. MB: Mushroom Body, FB: Fan-Shapped Body, EB: Ellipsoid Body, PPL1/PPM3 DA: Neuronas dopaminérgicas, PI: Pars Intercerebralis, I-LN_v/s-LN_v: Neuronas ventrales laterales, largas y cortas, ExFI2: Neuronas laterales tipo F. Los sitios inhibidores de sueño de MB, PI y neuronas I-LN_v promueven la vigilia. Las pequeñas neuronas laterales ventrales (s-LN_v) se arborizan en la vecindad de PI, lo que sugiere posibles modos de comunicación entre los dos grupos LN_v y el resto del circuito. El cuerpo elipsoide (EB) es un centro superior involucrado en la excitación mediada por el estrés. Las células ExFI2 envían

proyecciones postsinápticas hacia el Fan-Shaped Body (FB), y estas células producen sueño. Las neuronas dopaminérgicas pertenecientes al grupo PPL1 y / o PPM3 inhiben el FB para promover la excitación. Modificado de (Potdar and Sheeba 2013)

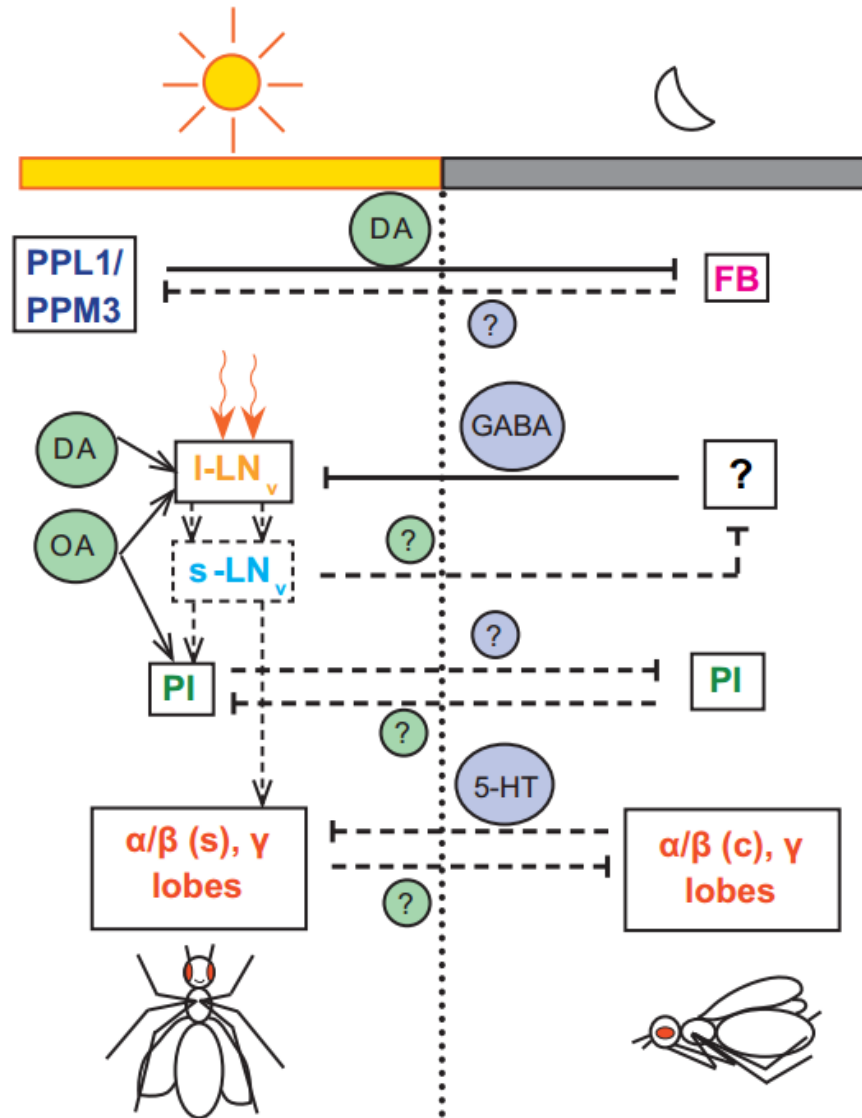


Figura 3. Organización del circuito de sueño dependiendo de la hora del día. Las líneas sólidas y discontinuas representan rutas conocidas y putativas, respectivamente. Los círculos sombreados verdes y azules representan las moléculas promotoras de la excitación y del sueño, respectivamente. Durante el día, cuatro caminos diferentes se conocen para promover la excitación. Las

neuronas de dopamina PPL1 / PPM3 (DA) inhiben el Fan-shaped Body FB que promueve el sueño y pueden tener un efecto más directo en la excitación. La luz actúa sobre neuronas largas ventrales (I-LN v), que también recibe señales de dopamina (DA) y octopamina (OA) para promover la excitación. OA también promueve la excitación mediante la estimulación de un subconjunto de neuronas del Par Intercerebralis (PI). Los lóbulos α / β de los Mushroom Bodies (MB) promueven la activación del circuito a través de la señalización de AMPc señalización inhibiendo el sueño. Estas estructuras de los MB y el PI podrían interactuar con I-LN v vía s-LN v, y entre sí a través de mecanismos aún desconocidos. Durante la noche, FB puede promover el sueño mediante la inhibición de la estimulación de neuronas DA PPL1 / PPM3. Aunque I-LNv todavía puede recibir una señal de activación de la DA, la excitación se inhibe por la acción inhibitoria de GABA sobre I-LNv. Es posible que las neuronas GABAérgicas envíen señales inhibitorias a la I-LNv durante el día. También el MB y el PI promovería el sueño por diversos mecanismos y vías de señalización. Sin embargo, el sitio de promoción del sueño en los MB podría promover el sueño mediante la inhibición de la inhibición del sueño sitio a través de la serotonina (5-HT), mientras que el PI puede promover el sueño mediante la inhibición de la excitación de neuronas asociadas al PI, mediante moléculas que aún son desconocidas. Modificado de (Potdar and Sheeba 2013)

En cuanto a la duración, puede prolongarse incluso la mitad del ciclo circadiano normal que dura 24 horas (Shaw and Cirelli 2000). En los períodos de sueño, los individuos de esta especie disminuyen su actividad cerebral, teniendo una casi nula respuesta a los estímulos externos (Cirelli and Bushey 2008). La duración del sueño en *Drosophila*, es influenciada por el sexo, durmiendo más los machos durante el día y las hembras durante la noche (Zimmerman *et al.* 2012) (Fig 4). Al igual que en humanos, en *Drosophila*, se producen fenómenos de compensación debido a privación del sueño. Es decir, individuos que son inducidos a no dormir, tienden a presentar mayor somnolencia en la siguiente fase del ciclo circadiano (Huber *et al.* 2004). Además, alteraciones o modificaciones a genes que regulan el ciclo circadiano, impiden a individuos concretar el sueño, similar a lo que ocurre en humanos, cuando existe alguna lesión del núcleo supraquiasmático cerebral (Shaw and Cirelli 2000). También en *Drosophila* existe una sensibilidad a fármacos y drogas, modificando el tiempo de sueño (Shaw and Cirelli 2000). Otro fenómeno observado en *Drosophila*, es la disminución del tiempo de sueño con la edad (Fig.5).

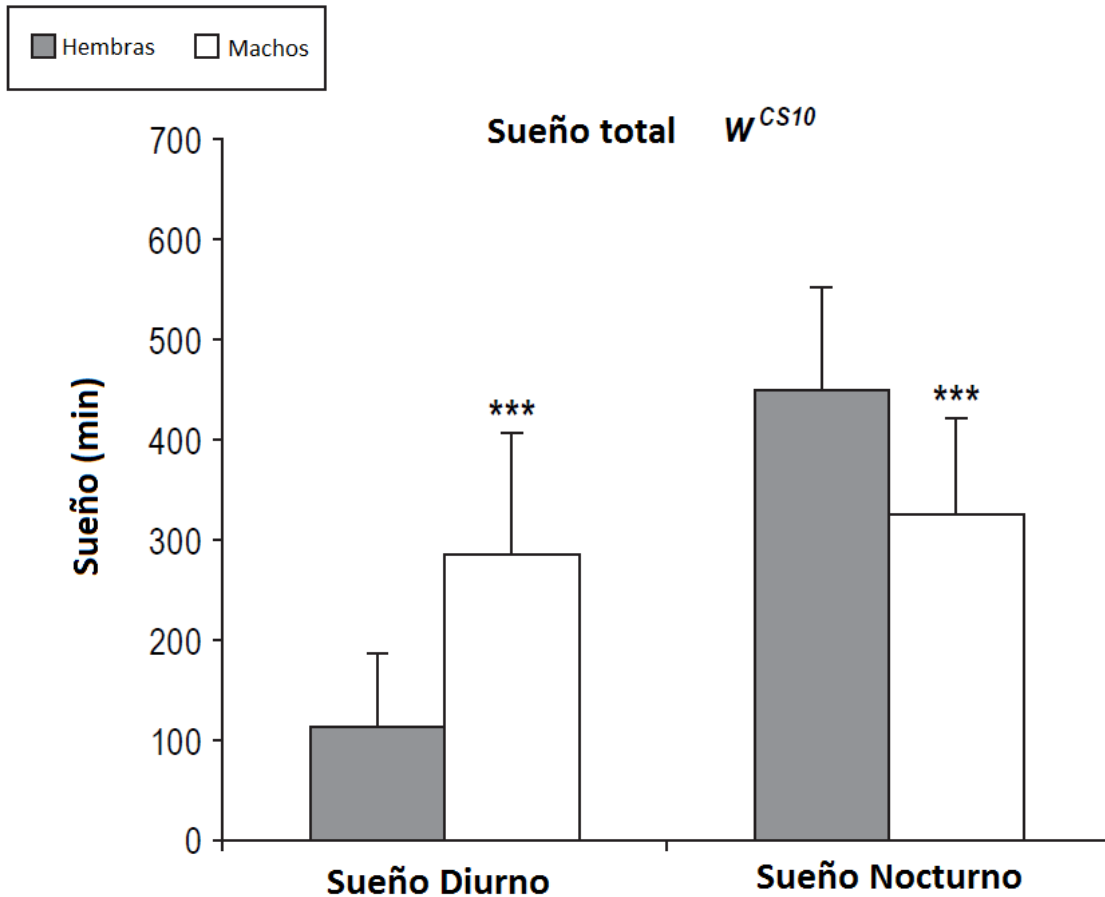


Fig 4. Sueño en *Drosophila melanogaster*.

Duración total del sueño en individuos adultos de *Drosophila*, medido en una línea WT Canton S. Machos duermen significativamente más que las hembras durante el día, mientras que las hembras duermen significativamente más que los machos durante la noche. Modificado de Genetic Fondo Has a Major Impact on Differences in Sleep Resulting from Environmental Influences in *Drosophila*. John E. Zimmerman et al (2011).

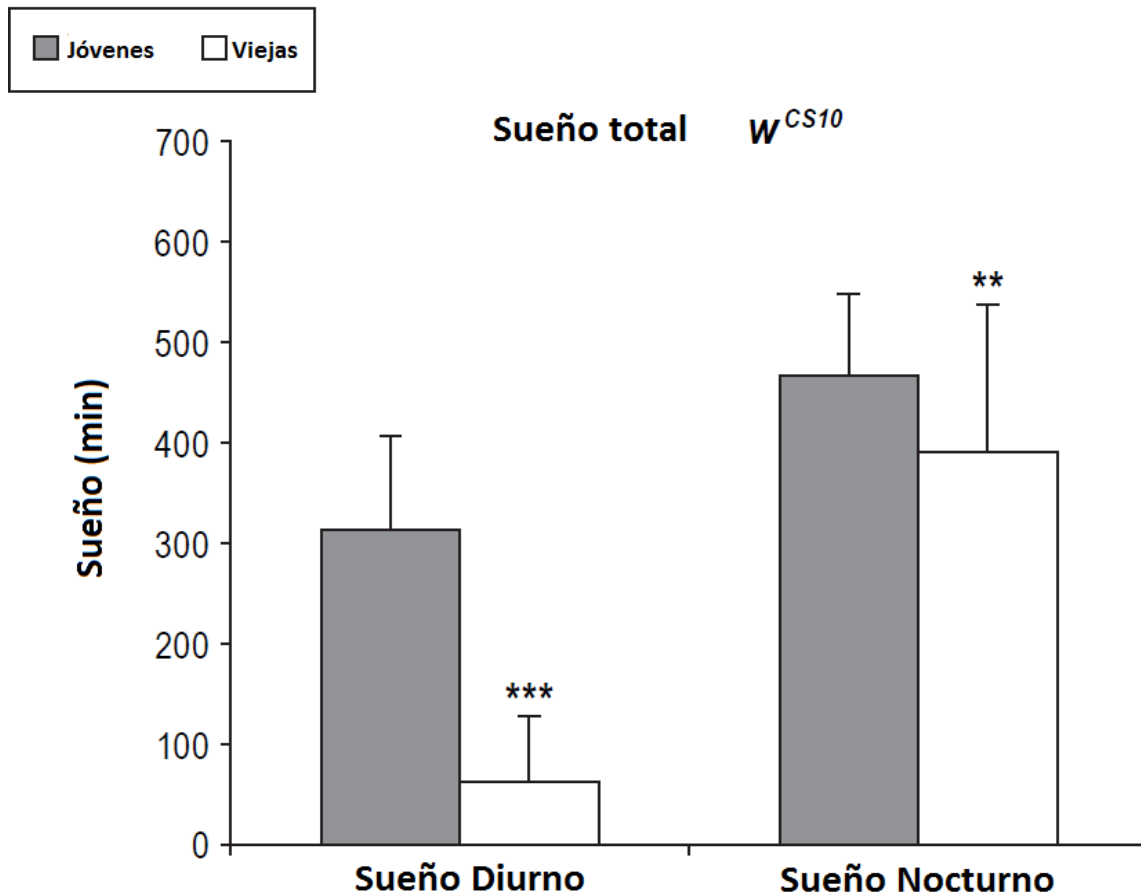


Fig 5. Sueño según edad en *Drosophila melanogaster*.

Duración total del sueño según edad de *Drosophila*, medido en una línea WT Canton S. Individuos jóvenes (10 días de edad) duermen significativamente más que individuos de edad avanzada (>56 días de edad). Modificado de Zimmerman et al (2011).

Los genes que regulan el ciclo circadiano y la duración del sueño en Humanos, también han sido descritos en *Drosophila melanogaster* (Tabla 1). En cuanto a la regulación de los patrones del sueño, genes humanos también poseen sus homólogos en *Drosophila*, entre ellos: los genes involucrados en la somnolencia diurna (Kornum *et al.* 2011), hora habitual de acostarse (Kornum *et al.* 2011), duración del sueño (Kornum *et al.* 2011), narcolepsia (Dauvilliers *et al.* 2004; Winkelmann *et al.* 2007; Cvetkovic-lopes *et al.* 2010; Kawashima *et al.* 2010; Lim and Scammell 2010; Toyoda *et al.* 2010), síndrome de piernas inquietas (Gottlieb *et al.*, 2004; Schormair *et al.*, 2008) y apnea del sueño (Gottlieb *et al.*, 2004) (Tabla 2). De esta manera, estudiar los desórdenes del sueño en esta especie es de gran utilidad para comprender los mecanismos normales y alterados en la especie humana.

Tabla 1: Genes involucrados en la regulación del ciclo circadiano. Genes humanos y sus homólogos en *Drosophila melanogaster*.

Gen Humano	Homólogo <i>Drosophila</i>
<i>CSNK2A1</i>	<i>Ckl1alpha</i>
<i>Period (PER1, 2 y 3)</i>	<i>Period (per)</i>
<i>Timeless (hTim)</i>	<i>Timeless (tim)</i>
<i>hCLOCK</i>	<i>Clock (Jrk)</i>

Tabla 2: Genes involucrados en la regulación de sueño. Genes humanos y sus homólogos en *Drosophila melanogaster*. Modificado de Harbison et al. (2013).

Rasgo o desorden del Sueño	Gen Humano	Gen <i>D. melanogaster</i>
Somnolencia Diurna	<i>PDE4D</i>	<i>dunce (dnc)</i>
	<i>EYA1</i>	<i>eyes absent (eya)</i>
Hora usual de acostarse	<i>OPCML</i>	<i>CG31646</i>
Duración del Sueño	<i>NCOA7</i>	<i>l(3)82Fd</i>
Narcolepsia	<i>P2RY11</i>	<i>peter pan (ppan)</i>
	<i>TRIB2</i>	<i>tribbles (trbl)</i>
	<i>Dscam</i>	<i>Dscam</i>
Síndrome de piernas inquietas	<i>MEIS1</i>	<i>homothorax (hth)</i>
Apnea del sueño	<i>ApoE</i>	<i>nudE</i>

Variación fenotípica de los patrones del sueño

En *Drosophila*, al igual que en humanos, existe una variación fenotípica en los patrones del sueño, la cual está determinada en su mayoría por componentes genéticos por sobre los ambientales (Zimmerman *et al.* 2012), es decir esta variación fenotípica se refiere a las diferencias cuantificables entre los patrones de sueño entre individuos de una misma especie. Este componente genético, afecta o regula la expresión de vías a nivel del SNC que modulan los patrones del sueño tanto en condiciones normales como patológicas (Harbison *et al.* 2013). En *Drosophila* la variación fenotípica de los patrones del sueño dada por los componentes genéticos fue estudiada por el grupo de Trudy Mackay. (Harbison *et al.* 2013). Utilizaron un panel de 200 líneas isogénicas secuenciadas que representan la variación genética de una población natural de *Drosophila melanogaster*, denominado DGRP (Mackay *et al.* 2012). Dado que se conoce la secuencia, las tasas de mutaciones y SNPs de cada una de estas líneas, se puede estudiar la variación fenotípica de algún carácter y cómo el ambiente influye en esta. Los resultados nos muestran rangos de tiempo promedio de sueño entre 122 a 689 minutos en hembras y 278 a 703 minutos en machos durante la noche. El sueño diurno varía entre 94 y 640 minutos en hembras y entre 120 y 682 minutos en machos entre líneas (Fig. 6). Además, el sueño es variable entre los individuos de una misma línea, variabilidad que aumenta en las líneas que tienen promedio de sueño menor (Fig. 7). Todos estos resultados son en base a un ciclo circadiano de 24 horas, en una proporción de luz/oscuridad de 1:1.

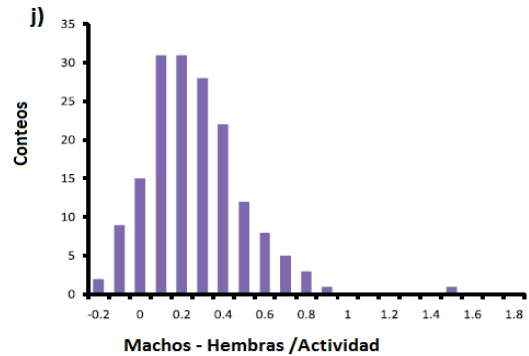
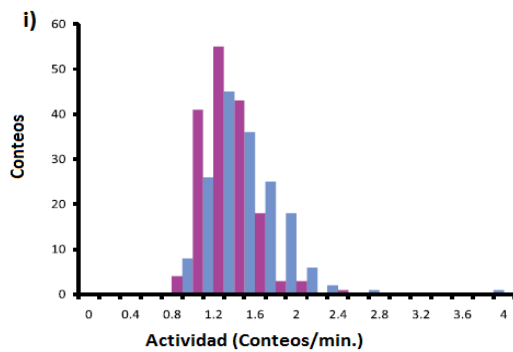
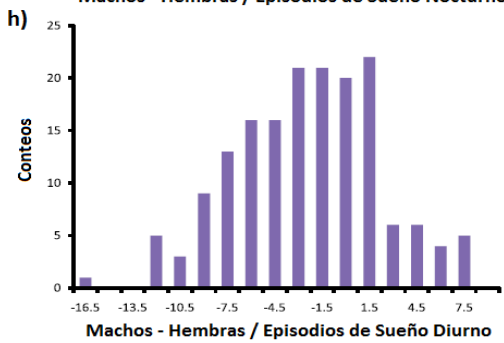
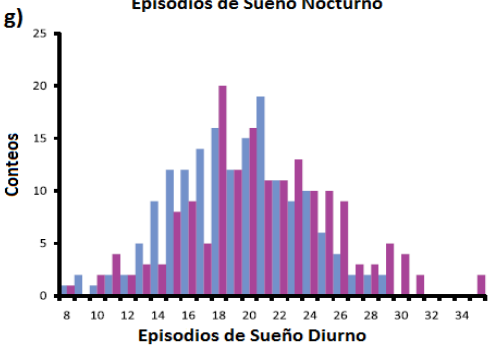
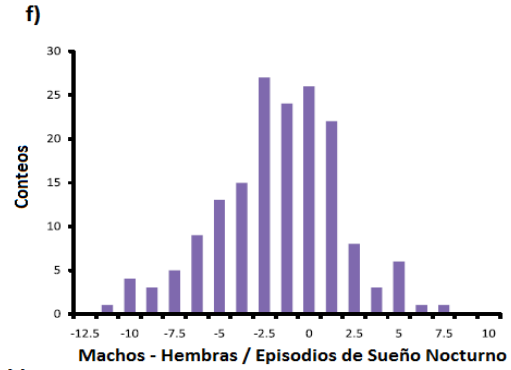
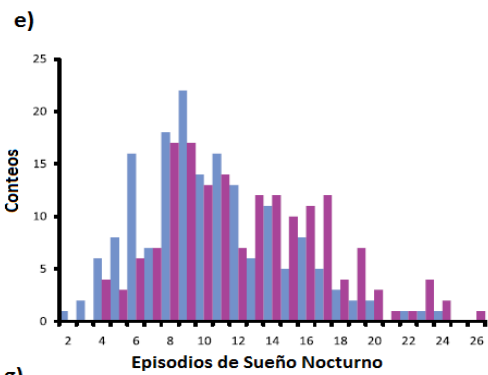
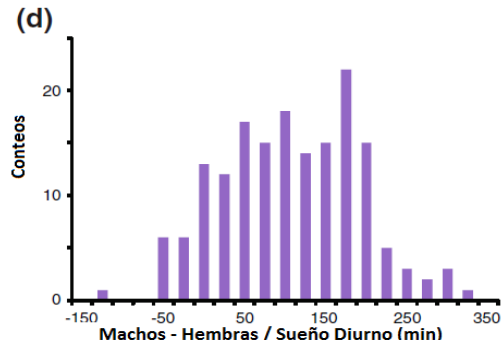
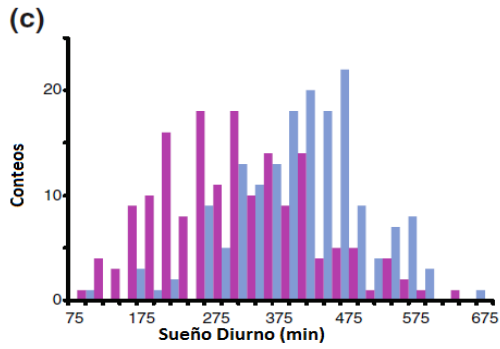
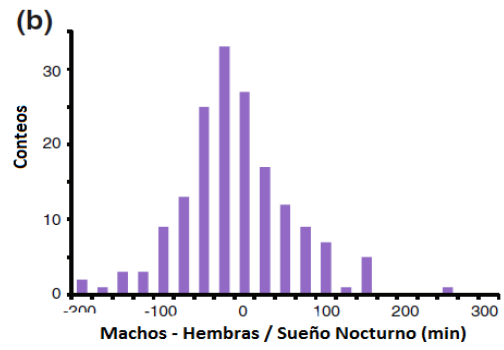
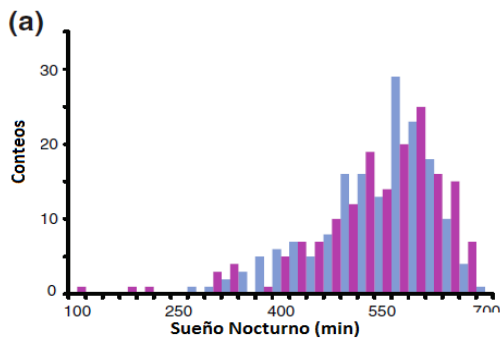


Fig. 6. Variación Fenotípica de Patrones del Sueño en *Drosophila*. (Machos, celeste; Hembras, Morado) (a-d) Histograma de los promedios para la duración del sueño. a) Sueño nocturno. b) Diferencias en sueño nocturno entre machos y hembras c) Sueño Diurno. d) Diferencias en sueño diurno entre machos y hembras. (e-h) Histograma de número de episodios de sueño. e) Episodios de sueño nocturno. f) Diferencias en episodios de sueño entre machos y hembras. g) Episodios de sueño diurno. h) Diferencias en episodios de sueño entre machos y hembras (i-j) Histograma de actividad. i) Actividad por tiempo despierto. j) Diferencia en actividad entre machos y hembras. En este estudio, asignaron aleatoriamente los ambientes a cada línea, por lo cual la varianza ambiental fue reducida al mínimo. Es por esto que las diferencias son asignables a la varianza genotípica entre las líneas. Modificado de Harbison et al. (2013).

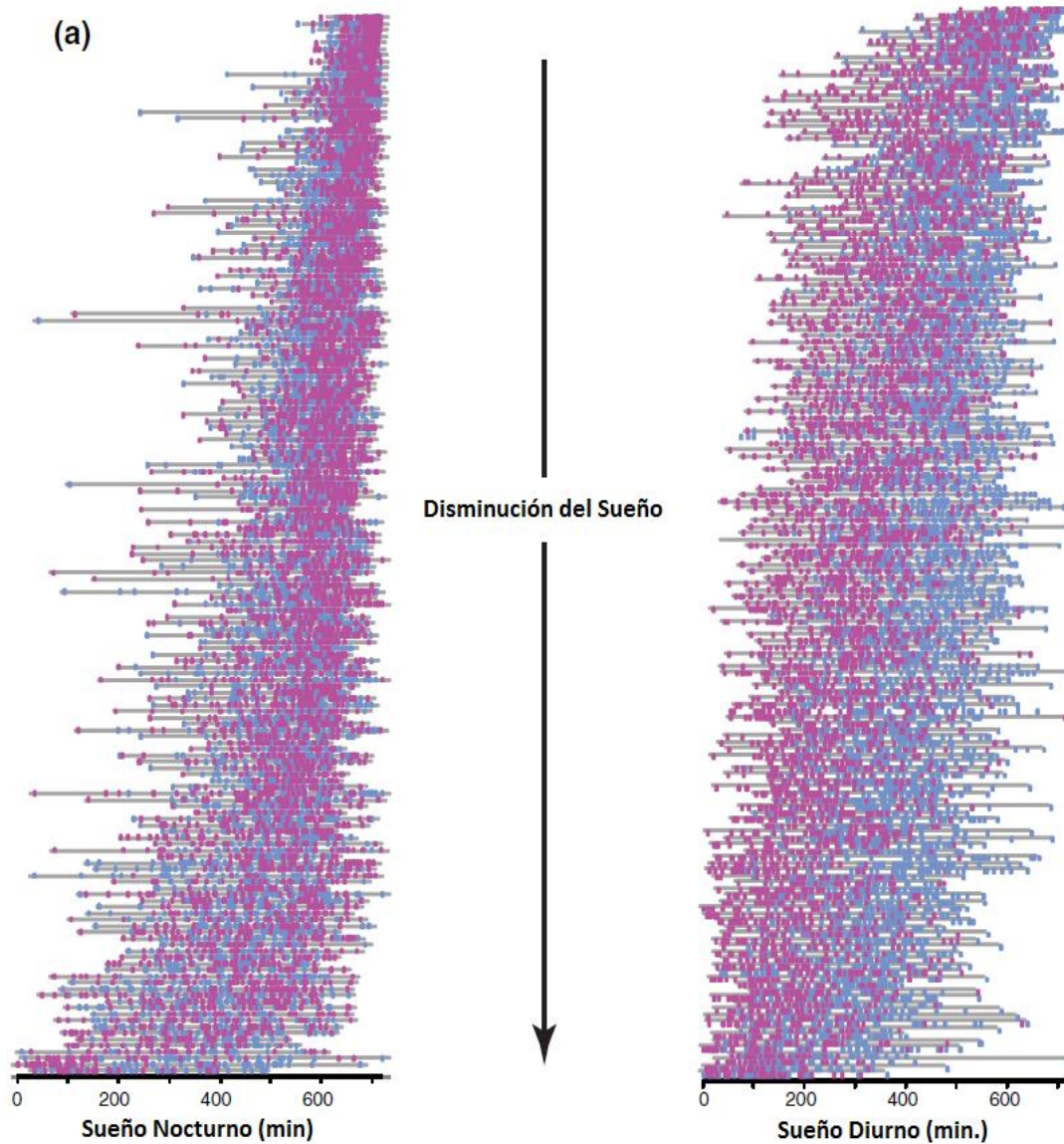


Fig. 7 Influencia del genotipo sobre la variabilidad individual en la duración del sueño a) Duración del sueño noche-día para cada individuo por línea. Machos – puntos azules / Hembras – puntos morados. Barras grises representan el rango de la duración del sueño, y la línea vertical negra, represental las líneas de mayor a menor duración del sueño. Modificado de Harbison et al. (2013).

Nutrición y Sueño

El ambiente juega un rol muy importante tanto en el desarrollo como en la mantención de los procesos fisiológicos de los individuos. Cuando el ambiente es alterado, es necesario que los individuos se adecúen a estos cambios, pudiendo alterar la fisiología normal del individuo, con modificaciones en su conducta o en sus órganos internos.

El sistema nervioso central (SNC) es altamente sensible a los cambios del ambiente, tales como la nutrición, el ejercicio y las drogas (Spéder *et al.* 2011). En el caso de la nutrición, una dieta baja en nutrientes afecta severamente algunas funciones cerebrales, tales como la memoria, la neurogénesis y el aprendizaje (Gottlieb *et al.* 2007). Cuando los desórdenes alimenticios o dietas restrictivas ocurren en la etapa prenatal producen un crecimiento fetal deficiente y un permanente mal funcionamiento del SNC, incluyendo desórdenes neurológicos y un temprano comienzo de la disminución de la cognición (St. Clair and He 2005; Xu *et al.* 2009; Rapoport *et al.* 2012). Todas estas alteraciones a nivel prenatal se expresan en la etapa adulta incluyendo gran variedad de desórdenes neurológicos (de Rooij *et al.* 2010). Así mismo una malnutrición prenatal en humanos aumenta al doble el riesgo de padecer esquizofrenia (Rehn *et al.* 2004). En esta patología se presentan síntomas como las alucinaciones, pérdida de capacidad cognitiva, emociones y comportamientos alterados, etc. Así también el sueño se afecta, teniendo estos pacientes cuadros de insomnio (Furukubo-Tokunaga 2009; Lumey *et al.* 2011; Shao *et al.* 2011; Calcagno *et al.* 2013).

Tal como en humanos los problemas de nutrición provocan alteraciones en la conducta y patrones del sueño en *Drosophila*. Durante el desarrollo de SNC de *Drosophila melanogaster*, se pueden diferenciar 2 etapas, una proliferativa y otra neurogénica (Lanet and Maurange 2014) (Fig. 8). La fase proliferativa es sensible a la cantidad de nutrientes disponibles para la proliferación de las células madres neuronales, por lo cual, un individuo sometido a restricción nutricional tendrá una menor tasa de proliferación (Lanet & Maurange, 2014). La etapa neurogénica en cambio, es independiente de la dieta, por lo que ocurre una diferenciación de los tipos celulares presentes en el SNC a partir de las células madres neurales (Lanet and Maurange 2014). De esta manera, se privilegia la mantención de los tipos celulares, por sobre la cantidad de neuronas, por lo que el individuo es viable y termina su desarrollo (Lanet and Maurange 2014).

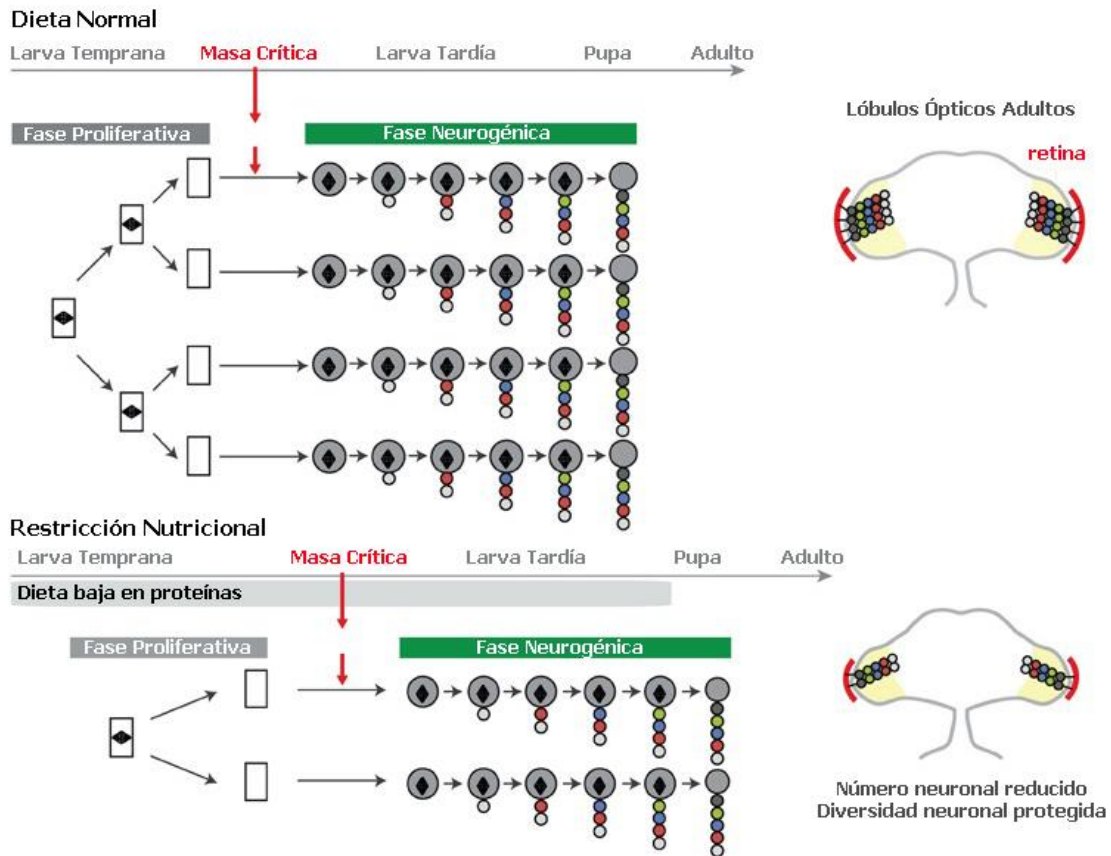


Figura 8: Plasticidad del desarrollo del lóbulo óptico de *Drosophila melanogaster* de larvas sometidas a restricción nutricional. En la etapa proliferativa ocurre una expansión del neuroepitelio (NE) que es dependiente de la dieta. En condiciones de restricción nutricional (RN) durante el período larvario, una cantidad reducida de señales nutricionales da cuenta de la expansión del NE y, en última instancia, a un reducido grupo de células madre neurales. Las células NE proliferantes están representadas por rectángulos que contienen un huso mitótico (forma de diamante). La inducción de la conversión neuroepitelial a neuroblastos posterior a haber alcanzado la masa crítica crítico puede asegurar que los neuroblastos se beneficien de almacenes nutricionales endógenos, lo que permite la integridad de la línea bajo RN. A la derecha, las neuronas producidas por los neuroblastos medulares están representadas en los lóbulos ópticos de la Cerebro adulto en condiciones normales o

déficit dietario. Bajo RN, los números neuronales se reducen, pero su diversidad se conserva. La retina se representa en rojo y se reduce a proporciones similares. Modificado de Lanet & Maurange (2014).

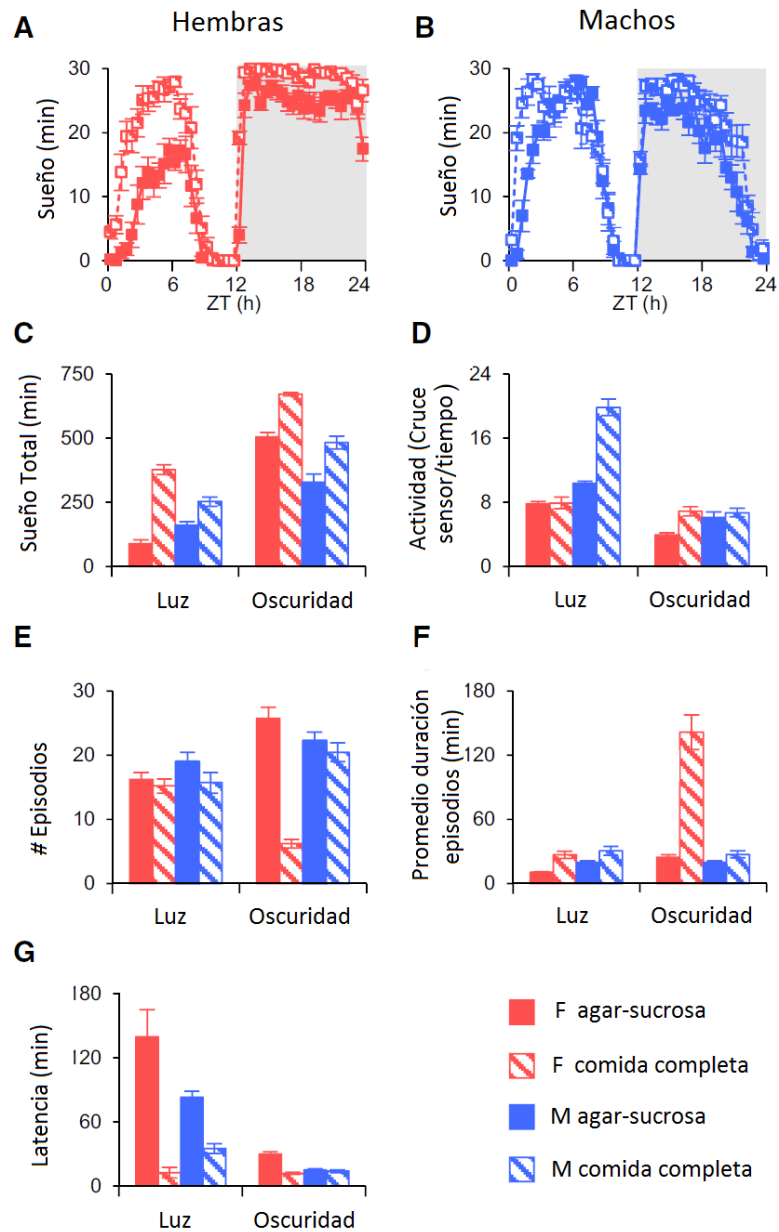


Figura 9: Las poblaciones de moscas duermen mejor con comida completa.

Perfiles de sueño para las poblaciones de hembras (**A**) y machos (**B**) de diferentes alimentos. **C** Cuantificación total de sueño. **D** actividad mientras se está despierto. **E** Número de episodios de sueño. **F** Duración de episodios de sueño, **G** Latencia. Las hembras se durmieron más rápido con alimento completo que solo con agar-sacarosa, mientras que los machos exhiben latencias similares en ambos medios de alimentos. n = 8 grupos para todas las condiciones. ZT, tiempo Zeitgeber; F, hembra; M, masculino. Modificado de Liu et al. (2015)

En esta especie, se han observado cambios significativos en los patrones del sueño en, estudios en donde se ha evaluado la calidad del alimento (Fig. 9) (Zimmerman *et al.* 2012). Estos estudios se basan en la comparación de dietas balanceadas entre proteínas y carbohidratos con otras basadas solo en carbohidratos. Machos y hembras duermen significativamente menos durante el día con una dieta compuesta solo por sucrosa (Zimmerman *et al.* 2012). Sin embargo, se desconoce cómo los cambios producidos por una restricción nutricional durante el desarrollo afectan los comportamientos de los adultos de *Drosophila melanogaster*, en especial el sueño, y también se desconoce si el fondo genético de los individuos es capaz de modificar el efecto de una dieta restrictiva de nutrientes sobre este comportamiento.

Para responder a esta pregunta, se utilizará un modelo de restricción nutricional durante el estadio larvario en individuos de *Drosophila melanogaster* con distinto fondo genético, utilizando líneas isogénicas de una población denominada DGRP. DGRP consiste en más de 200 líneas derivadas de una única población no

consanguínea, obtenidas luego del apareamiento endogámico de cada línea durante 20 generaciones. DGRP contiene una muestra representativa de la variación genética *Drosophila*, tiene un mapa de recombinación adecuado para la localización precisa de variantes causales, y tiene información casi completa de la secuencia eucromatínica. Del total de líneas, se utilizaron 20 líneas de un subgrupo denominado core 40, descrito por Ayroles et al. (2009).

En conclusión, el objetivo de esta tesis será determinar el efecto de la interacción genético-nutricional prenatal sobre la variación de los patrones del sueño de individuos adultos de *Drosophila melanogaster*.

Hipótesis

La variación genética de *Drosophila melanogaster* modifica el efecto de la restricción prenatal de nutrientes en los patrones de sueño de los adultos.

Objetivos

Objetivo General

- Determinar el efecto de la interacción genético-nutricional prenatal sobre la variación de los patrones del sueño de individuos adultos de *Drosophila melanogaster*.

Objetivos Específicos

1. Establecer un protocolo de restricción nutricional prenatal y observar su efecto en el desarrollo y viabilidad de 20 líneas isogénicas del DGRP.
2. Evaluar los patrones del sueño de individuos adultos en 20 líneas isogénicas del DGRP con y sin restricción nutricional prenatal.
3. Determinar efectos genéticos, nutricionales y de interacción en los patrones de sueño entre las distintas líneas DGRP

Materiales y métodos

Unidad de observación

Se utilizaron ejemplares de 20 líneas distintas de adultos DGRP de *Drosophila melanogaster*. Esta especie posee los siguientes cromosomas: 2L, 2R, 3L, 3R y X. Estos individuos fueron mantenidos en viales con dieta control o diluida según corresponda, mantenidos en ciclos de luz- oscuridad de 12 horas y a 25 grados para facilitar su cruce y eclosión.

Criterios de selección

Se recolectaron individuos adultos de 3-7 días de edad. Las condiciones que se utilizaron son las establecidas en el laboratorio de Genética del desarrollo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, a 25° C, en condiciones de luz/oscuridad de 1:1.

The *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel (DGRP) ²⁴.

Este proyecto nació como una comunidad con el fin de investigar genética de poblaciones y rasgos cuantitativos. DGRP consiste en más de 200 líneas derivadas de una única población no consanguínea, obtenidas luego del apareamiento endogámico de cada línea durante 20 generaciones. DGRP contiene una muestra representativa de la variación genética *Drosophila*, tiene un mapa de recombinación adecuado para la localización precisa de variantes causales, y tiene información casi completa de la secuencia eucromatínica. DGRP es una herramienta poderosa para reducir rápidamente el espacio de búsqueda de variantes moleculares que afectan a los rasgos cuantitativos de todo el genoma, a polimorfismos y genes candidatos. Del

total de líneas, se utilizó un subgrupo denominado core 40, descrito por Ayroles et al. (2009) consistente en 20 de estas líneas (Anexo 1).

Consideraciones éticas

Este protocolo está aprobado según la reglamentación de la Comisión de Ética de la investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y su protocolo está integrado en el proyecto Conicyt “*Drosophila* Ring in Developmental Adaptations to Nutritional Stress (DRiDANS)”.

Tamaño muestral

De acuerdo al protocolo usado en Harbison et al. (2013), se utilizaron 8 individuos de cada sexo y cada línea para estudiar los patrones de sueño y actividad.

Técnicas y métodos utilizados

Dieta: De acuerdo a Bass et al. (2007), se realizaron distintas diluciones (0,5x; 0.2x; 0,1x) de la dieta normal que ellos proponen (Tabla 3). Se realizará un ANOVA con test de Dunnett para comprobar las diluciones y el control.

Tabla 3 Receta para dieta estándar o control por un Litro

Levadura de Cerveza	100 g
Glucosa	50 g
Agar	15 g
Ac. Propiónico	6 ml
Nipagin	30 ml

Protocolo de obtención de individuos.

Se seleccionaron 40 hembras y 20 machos por cada línea y fueron puestos en botellas para que se desarrollara la ovoposición durante 4 días. Luego se recolectaron nuevos adultos para realizar el procedimiento de 48 horas de ovoposición en dieta normal. El ciclo completo de desarrollo dura alrededor de 10 días para dieta control y 14 días para comida baja en nutrientes. De esta manera, se sincronizó la eclosión en ambas condiciones.

Cuantificación de fenotipos

La actividad de las moscas se midió con un sistema automatizado para evaluar su tránsito por unidad de tiempo. Para realizar esta medición se utilizó *Drosophila* Activity Monitoring System (DAMs5) de Trikinetics. Este método consiste en una base con 32 canales, en donde cada canal tiene un tubo de vidrio de 5 mm de diámetro con un sistema infrarrojo central en los cuales se puso un individuo por cada tubo (Harbison *et al.* 2013) (Fig. 10) con una comida estándar agar-sucrosa al 5%. Las moscas fueron previamente anestesiadas con CO₂. Este estudio se realizó para cada línea isogénica en ambas condiciones de alimentación. Los individuos se analizaron en dos ciclos, uno de 12 horas de luz y otro de 12 horas de oscuridad, durante 4 días. El análisis de datos se hizo en el programa PySolo.

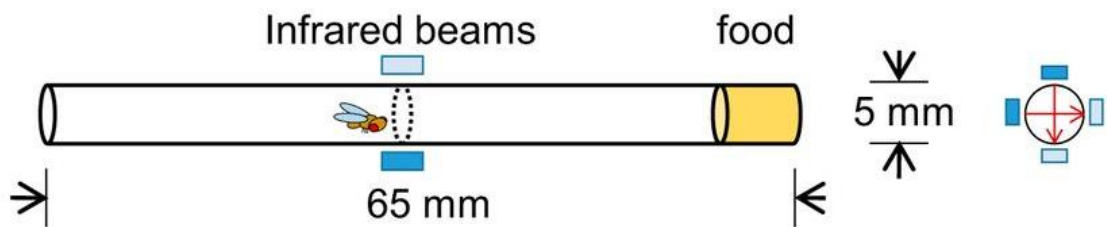


Figura 10. Sistema DAMs Trikinetics. Consiste en 32 tubos de 5 mm de diámetro, y 65 mm de largo. En el centro, posee un sensor infrarrojo que detecta el movimiento del individuo.

Fenotipos Evaluados

Actividad: Se refiere al número de veces en que el individuo cruza el sensor infrarrojo, dividido por el tiempo en que está despierto. La actividad fue medida en cada hora en tiempo de Zeitgeber: 0-12 horas etapa de luz / 12-24 horas etapa de oscuridad.

Latencia: Se refiere al tiempo en que un individuo demora en comenzar un período de sueño.

Duración del sueño: tiempo de inmovilidad mayor a 5 minutos. Esta medición se hizo en individuos machos y hembras, en ciclos de luz/oscuridad 1:1, para ambas condiciones nutricionales. Se sumaron todas las mediciones para obtener la duración total del sueño. Se medirá además el sueño diurno y nocturno.

Número de períodos de sueño (NES): Se refiere a la cantidad de veces durante el día en que el individuo entra en un lapso de sueño. Estos cálculos se hicieron por línea y sexo, además del número por sueño diurno (NESD) y nocturno(NESN).

Promedio de períodos de sueño (PES): Se obtuvo un promedio de la duración de todas las veces que duermen los individuos. Estos cálculos se hicieron por línea y sexo, además del promedio por sueño diurno (PESD) y nocturno (PESN).

Análisis Estadístico

Se recolectaron los datos en Microsoft Excel. Todos los cálculos se realizaron en R (R Core Team, 2016). Se estimaron medias para cada variable estudiada. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizaron dos modelos estadísticos, el primero se ajustó de forma separada en cada el sexo que incluye solo interacciones dobles. El segundo modelo contiene el sexo como factor, por lo que además incluye una interacción triple. Estos modelos se aplicaron para los 9 fenotipos estudiados.

$$\text{Modelo 1: } Y_{ijl} = \mu + D_i + L_j + DxL_{ij} + e_{ijl}$$

$$\text{Modelo 2: } Y_{ijkl} = \mu + D_i + L_j + S_k + DxL_{ij} + LxS_{jk} + DxS_{ik} + DxLxS_{ijk} + e_{ijkl}$$

Donde D_i corresponde al efecto de la Dieta, L_j de la línea, S_k del sexo, DxL_{ij} , LxS_{jk} , DxS_{ik} , y $DxLxS_{ijk}$ son los efectos de interacción doble y triple, y e_{ijkl} el error.

El Modelo 1 se utilizó para estimar los componentes de varianza σ_L^2 , σ_{DxL}^2 y σ_e^2 para cada sexo. El modelo 2 se utilizó para estimar la significancia de cada efecto, marginal y de interacción, mediante ANOVA. Para realizar estos análisis, se estimaron las siguientes sumas de cuadrados:

Modelo 1

$$SSD = gr \sum_i (\bar{y}_{i\cdot} - \bar{y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$SSL = dr \sum_j (\bar{y}_{j\cdot} - \bar{y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$SSE = \sum_i \sum_j \sum_l (y_{ijl} - \bar{y}_{ij})$$

$$SSE = \sum_i \sum_j \sum_k \sum_l (y_{ijkl} - \bar{y}_{ijk})$$

Modelo 2

$$SSD = sgr \sum_i (\bar{y}_{i\cdot\cdot} - \bar{y}_{\dots})^2$$

$$SSL = sdr \sum_j (\bar{y}_{j\cdot\cdot} - \bar{y}_{\dots})^2$$

$$SSS = dgr \sum_k (\bar{y}_{k\cdot\cdot} - \bar{y}_{\dots})^2$$

En donde SSD la suma de los cuadrados por Dieta, SSL es la suma de cuadrados entre líneas, SSS es la suma de cuadrados entre sexos y SSE la suma de los cuadrados del error. La constante k corresponde al número de sexos (2), d es el número de dietas, g es el número de líneas, y r es el número de réplicas por línea por sexo.

La estimación de los componentes de varianza fenotípica se realizó por el método de los cuadrado medios. Se estimó la varianza genotípica σ_L^2 , la varianza del genotipo debido al tratamiento $\sigma_{D \times L}^2$ y la varianza del error σ_E^2 a partir del despeje de las ecuaciones para la esperanza de los cuadrados medios [E(M.S.) por su sigla en inglés] indicadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Tabla ANOVA, en la cual se muestran las esperanzas de los cuadrados medios para el Modelo 2.

	Grados de libertad	M.S	E(M.S)
Dieta	$d - 1$	SSD	$\sigma_{\varepsilon}^2 + r\sigma_{DxL}^2 + gr \sum \frac{a^2}{a - 1}$
Líneas	$g - 1$	SSL	$\sigma_{\varepsilon}^2 + r\sigma_{DxL}^2 + dr\sigma_L^2$
DxL	$(d - 1)(g - 1)$	$SST - SSD - SSL$	$\sigma_{\varepsilon}^2 + r\sigma_{DxL}^2$
Error	$dg(r - 1)$	SSE	σ_{ε}^2

Para determinar la significancia de cada factor en el Modelo 1 se estimó el estadístico F y el Valor-P y se consideró un 95% de significancia.

Se realizó la estimación de la heredabilidad en sentido amplio para cada variable y el índice de interacción genético-ambiental, para medir los efectos de la dieta según cada genotipo, por sobre el efecto marginal de la dieta. La varianza genotípica, varianza genotípica dada por el tratamiento y la varianza del error fueron estimadas a partir del modelo ANOVA. En este caso, debido a la utilización de líneas isogénicas, que provienen de 20 generaciones de endogamia, se atribuye la varianza entre grupos a componentes genéticos, además de que los efectos ambientales se espera que se distribuyan aleatoriamente entre líneas, por lo que el efecto de que el ambiente haya favorecido a alguna línea se desprecia.

La heredabilidad en sentido amplio se estimó con la siguiente fórmula:

$$\hat{H}^2 = \frac{\sigma_L^2}{\sigma_L^2 + \sigma_{D \times L}^2 + \sigma_E^2}$$

Adicionalmente, definimos un Índice de la varianza debida a interacción genético-ambiental (\hat{I}^2) como:

$$\hat{I}^2 = \frac{\sigma_{D \times L}^2}{\sigma_L^2 + \sigma_{D \times L}^2 + \sigma_E^2}$$

Resultados

1. Establecer un protocolo de restricción nutricional prenatal y observar su efecto en el desarrollo y viabilidad de un grupo de líneas isogénicas del DGRP.

Si bien, la dieta estándar en que son mantenidos los stocks de *Drosophila* en el laboratorio es en base a levadura de pan, en esta tesis se utilizó levadura de cerveza, debido a que reportes de la literatura, demuestran una mayor efectividad de este tipo de levadura para estudios de restricción nutricional (Bass *et al.* 2015). Esto, debido a que favorecen la ovoposición y el desarrollo de los individuos. En la Tabla 4 se muestran las diluciones para 1 litro de la dieta control usadas para establecer el protocolo de restricción nutricional. Los otros ingredientes de la dieta, Nipagin (30 ml), Ácido Propiónico (6 ml) y Agar (13 gr), permanecieron constantes en ambas dietas.

Tabla 5: Protocolos de dilución de dieta control

Ingrediente	Dilución	1x (control)	0.5x	0.2x	0.1x
Levadura de Cerveza		100 g	50g	20g	10g
Glucosa		50g	25g	10g	5g

De las 3 diluciones usadas, se analizaron tiempos de desarrollo y día de eclosión de los individuos, en 10 líneas seleccionadas al azar. Los promedios del tiempo de desarrollo, se muestran en la Fig. 11. Se calcularon los valores de significancia con ANOVA con un test de Dunnett, en el tiempo de eclosión y las 3 diluciones probadas, y las 3 diluciones mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al

control. El p-value para todas las diluciones fue menor a 0,001. Se descartó el uso de la dieta de 0.1x debido a que se observó una baja ovoposición y por tanto poca cantidad de individuos. Luego de realizar observaciones de tiempo de eclosión, se concluyó que la dilución de 0.2x era la mejor dieta de restricción calórica, ya que era la dieta más extrema que permitía el desarrollo de los individuos y cumplía con el criterio de tiempo establecido.

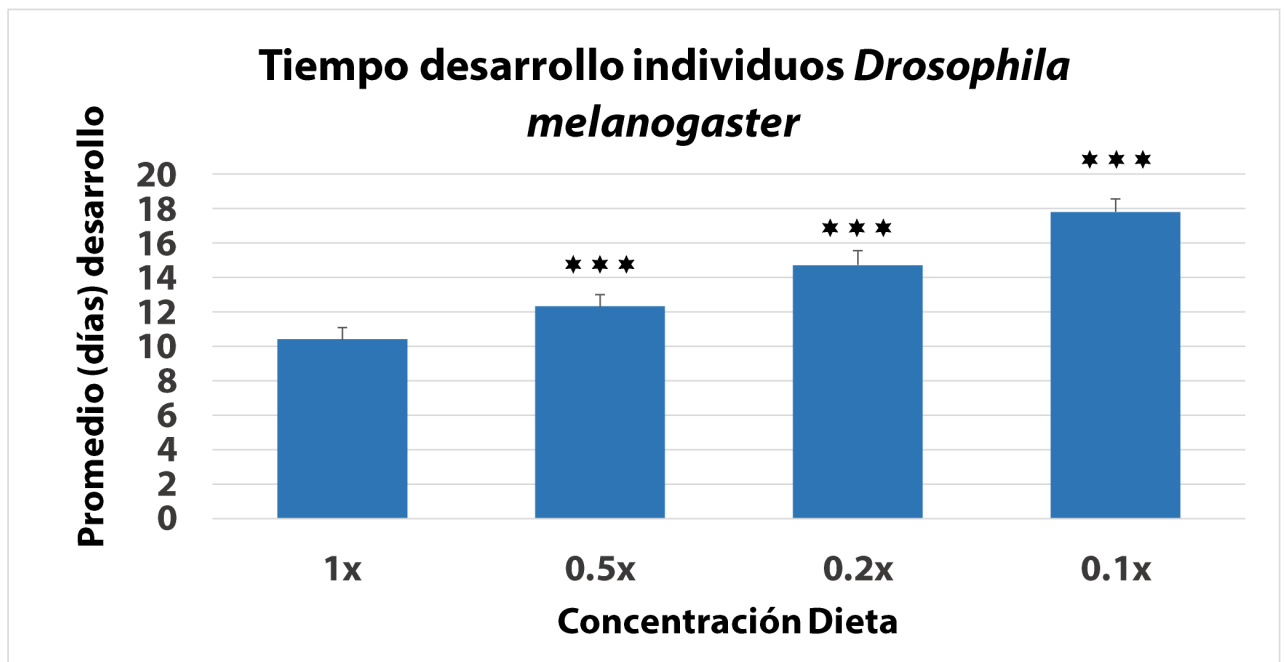


Figura 11. Tiempo de desarrollo en días de individuos de *Drosophila melanogaster* en comida normal y 3 diluciones (0.5x, 0.2x 0.1x)

2. Evaluar los patrones del sueño de individuos adultos en un grupo de líneas isogénicas del DGRP con y sin restricción nutricional prenatal.

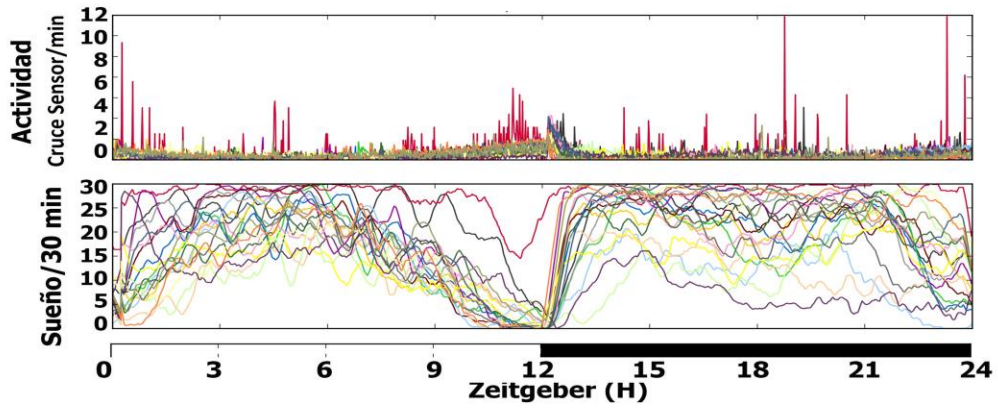
Con el fin de evaluar el efecto de la dieta en la variación de los patrones del sueño, se estudiaron 20 líneas isogénicas seleccionadas desde el core 40 de DRGP (Mackay *et al.* 2012) en las cuales se midió tiempo de sueño total, tanto diurno como nocturno, cantidad de períodos de sueño, duración promedio de los períodos, latencia y la actividad. Está definido como sueño al período de inactividad superior a 5 min, siendo usado ese valor de referencia en este estudio (Shaw and Cirelli 2000; Harbison *et al.* 2013). Se observaron los perfiles de sueño y actividad de 20 líneas DGRP, en ambos sexos y condiciones (Fig. 12). Se observan perfiles distintos de sueño para las líneas estudiadas (Fig 12a), mostrando además altos niveles de actividad al momento de cambiar el ciclo de luz a oscuridad, similar a lo reportado en la literatura (Liu *et al.* 2015). Líneas como 25445 mostraron un perfil de sueño por 30 min más bajo que las demás líneas, tanto como en machos y hembras de dieta normal (Fig. 12a y 12c).

Tal como reportó Harbison *et al.* (2013) se observaron tiempos de sueño total distintos entre las líneas estudiadas (Fig.12), siendo significativas para ambos sexos y condiciones experimentales (Tabla 6). Asimismo, todos los fenotipos en ambos sexos y condiciones mostraron diferencias significativas entre las líneas estudiadas en ambas condiciones experimentales, excepto PESD en machos en comida normal. Cuando realizamos la comparación entre el efecto de las dietas por si solas, se observan diferencias significativas en 6 de los 9 fenotipos estudiados en hembras y en 5 fenotipos estudiados en machos.

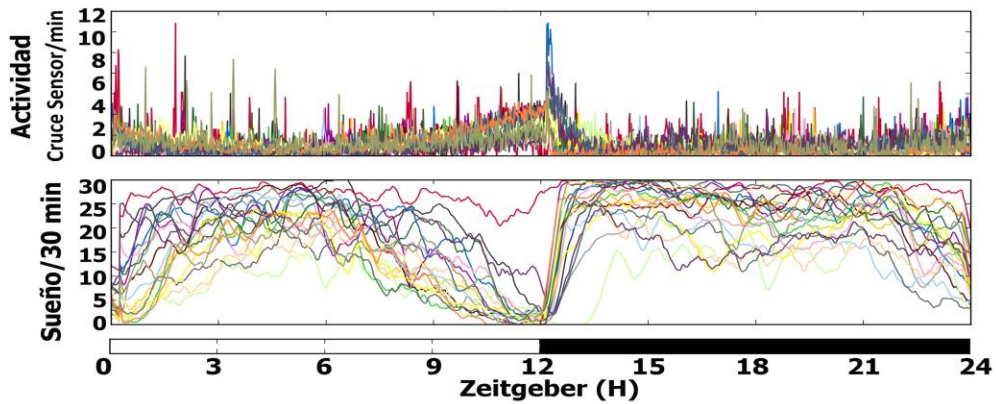
Tabla 6: Variación fenotípica debido al genotipo en los patrones del sueño en hembras y machos adultos de *Drosophila melanogaster* en ambas dietas. En negrita se muestran los valores significativos.

Fenotipo	Hembras				Machos			
	Dieta Normal		Dieta restrictiva de nutrientes		Dieta Normal		Dieta restrictiva de nutrientes	
	Promedio	p value	Promedio	p value	Promedio	p value	Promedio	p value
Sueño Total	687,8±21	4,7E-25	775,8±19,1	2,7E-17	882±19	1,4E-34	843±18	7,7E-16
Sueño Diurno	237,6±12,9	3,4E-19	265±12,62	7,3E-23	363,5±11	2,5E-17	367,4±9	1,8E-26
Sueño Nocturno	450,1±13,5	5,1E-43	510,7±11	4,6E-10	518,5±11	1,2E-47	475,6±12,3	3,2E-11
Actividad	1,4±0,03	1,3E-28	1,43±0,04	1,5E-14	1,66±0,04	2,9E-18	1,8±0,03	2,8E-22
NESD	18,44±0,09	3,8E-09	18,45±0,1	3,2E-07	17,4±0,06	1,8E-17	17,9±0,16	7,2E-06
NESN	16,95±0,1	3,7E-15	15,76±0,1	3,3E-13	14,9±0,07	9,2E-12	15,4±0,16	1,3E-08
PESD	12,88±1,6	3,2E-07	14,36±1,7	0,5326	20,8±2,6	1,2E-20	20,4±2,6	3,9E-09
PESN	26,54±4	1E-06	32,38±4,87	1,5E-11	34,7±4,89	1,3E-15	30,8±4,4	9,5E-12
Latencia	55,60±5,9	1,1E-18	46,86±5,1	1,8E-07	36,4±2,95	4,1E-09	41,7±3,5	9,6E-17

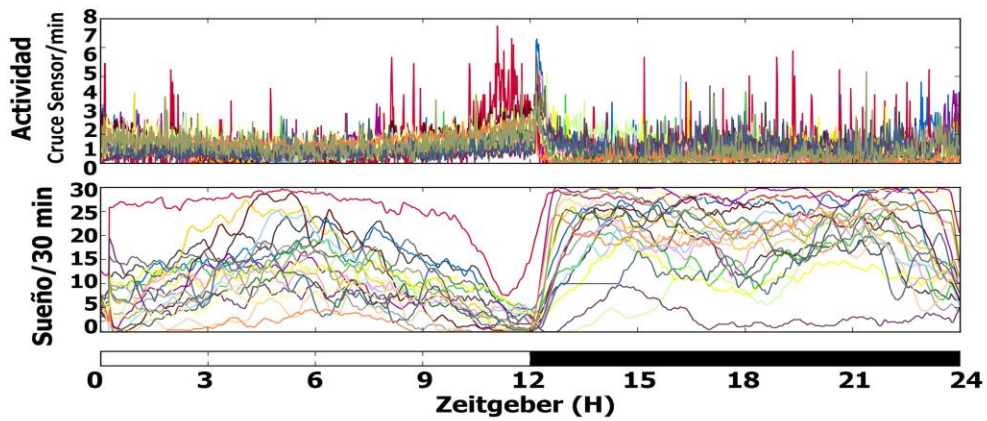
a) Machos en dieta control



b) Machos en dieta restrictiva de nutrientes



c) Hembras en dieta control



d) Hembras en dieta restrictiva de nutrientes

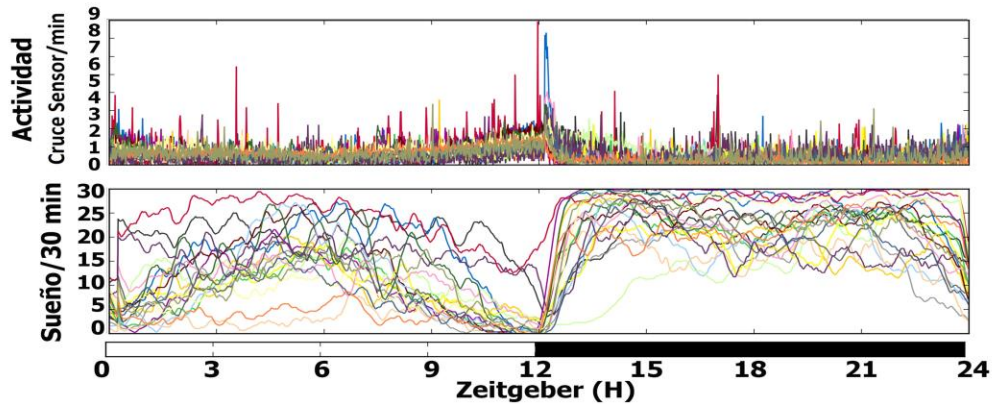


Figura 12: Perfiles de sueño y actividad para 20 líneas DGRP. El panel superior de cada grupo muestra el índice de actividad, que corresponde al cruce por el haz de luz por minuto a lo largo de un ciclo de luz/oscuridad. El panel inferior muestra los minutos invertidos en sueño en un lapso de 30 minutos. Se observan altos índices de actividad cercanos al final del ciclo de luz. (t 12 zeitgeber), además de diferencias en los perfiles de sueño entre las líneas estudiadas. Cada color representa una línea (leyenda no mostrada) para ambos sexos y condiciones dietarias. Se destaca la línea 25445 (morado), en donde, hembras en condición normal presentan un tiempo de sueño nocturno menor a sus pares en restricción nutricional.

Para ver el efecto que tiene una dieta prenatal restrictiva de nutrientes en diferentes genotipos, se compararon promedio de sueño, tanto diurno (PESD) y nocturno (PESN), y otros fenotipos asociados a patrones de sueño, en 20 líneas de DGRP. Cuando se realiza la comparación del sueño total entre la dieta normal y la dieta restrictiva de nutrientes por línea, en machos se observa que 4 líneas muestran diferencias significativas (Fig. 13a). La línea 25179, presenta una disminución significativa del tiempo total de sueño ($p=0.02$) con respecto a su control normal. Similar a lo que ocurre en la línea 25198, que disminuye significativamente el tiempo total de sueño cuando los individuos se desarrollan en comida restrictiva de nutrientes ($p=0.04$). La línea 25208 muestra una disminución significativa del sueño total en condiciones de restricción nutricional ($p=0.018$), mientras que la línea 25445 presenta un aumento significativo de este parámetro en comparación con la dieta normal ($p=0.0085$). En el caso de las hembras, hubo un aumento significativo del sueño total

en 7 de las líneas estudiadas. 25177, 25188, 25192, 25197, 25204, 25210 y la línea 25445 (Fig. 13b). En el resto de las líneas estudiadas las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 12b). Se encontró dimorfismo sexual para sueño total en las líneas 25177, 25179, 25180, 25197 y 25445. Nuestros resultados muestran que existen una variación natural en el tiempo total de sueño en ambas condiciones estudiadas dado en distinto fondo genético de las líneas.

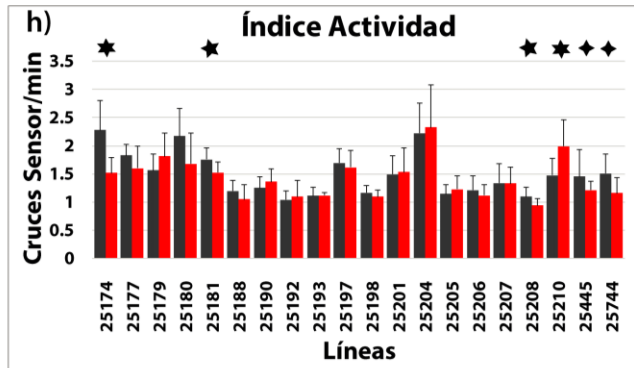
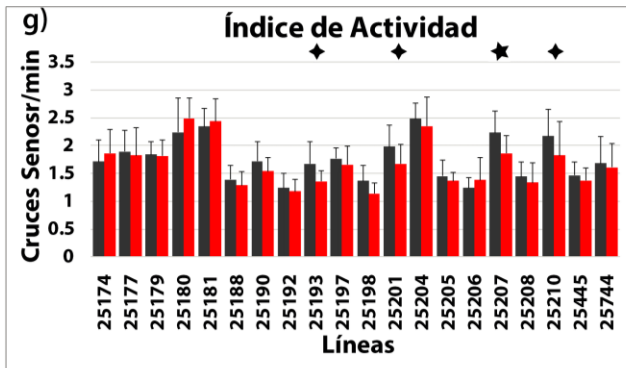
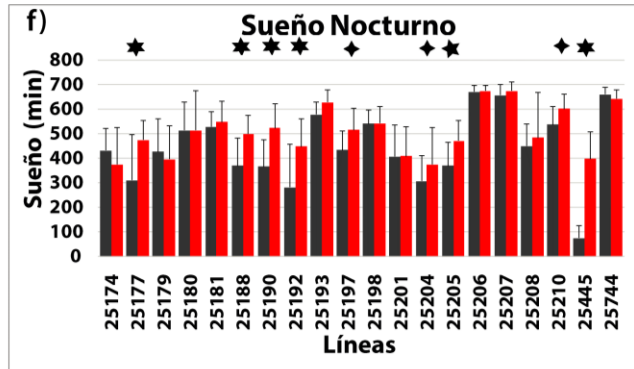
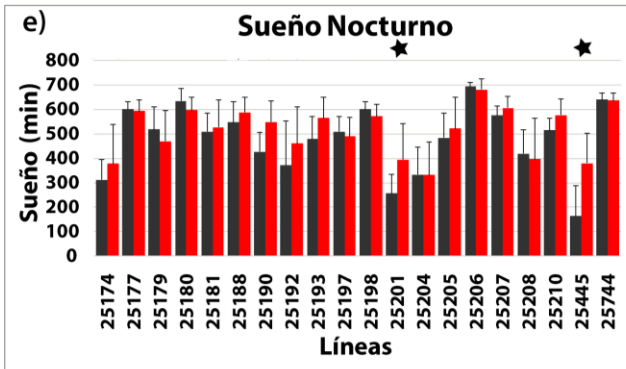
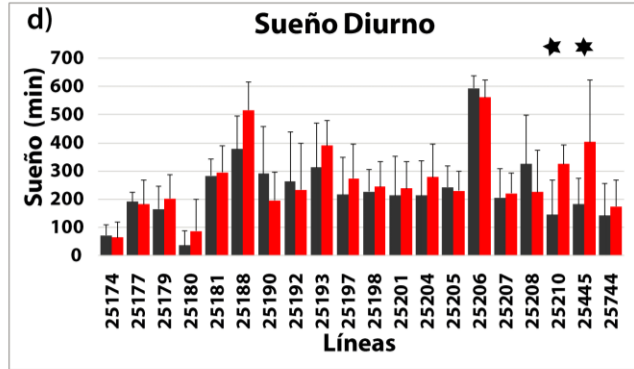
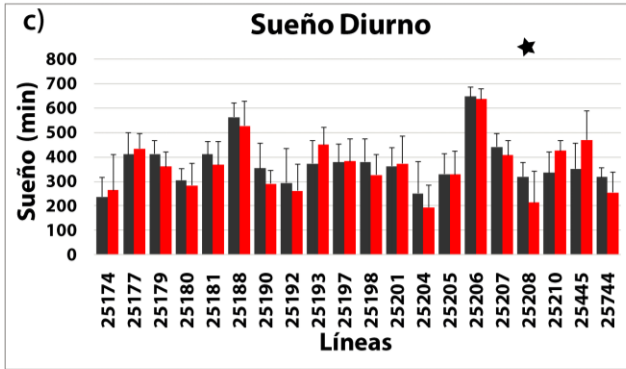
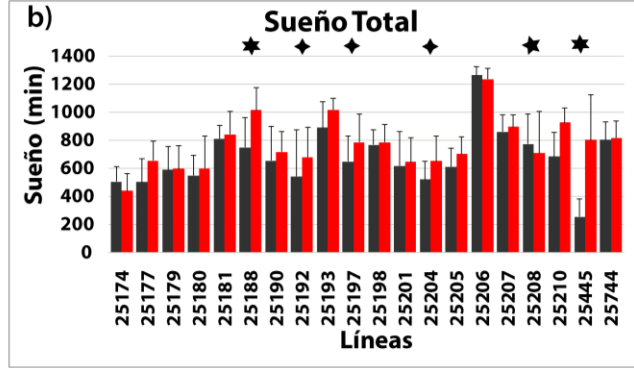
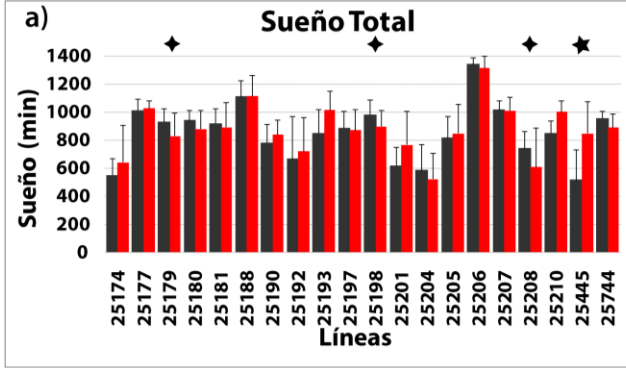
Dado que el estudio del sueño total puede enmascarar diferencias específicas de sueño en diferentes períodos del ciclo analizamos el sueño diurno y nocturno en las dos condiciones nutricionales prenatales. En el caso de los machos se observan diferencias significativas en 25208 para el sueño diurno (Fig. 13c); 25179, 25180 y 25445 para sueño nocturno (Fig. 13e). En las hembras, las diferencias significativas para sueño diurno se observaron en las líneas 25188, 25210 y 25445 (Fig. 13d). En el total de sueño nocturno las siguientes líneas mostraron diferencias significativas: 25177, 25192, 25197, 25210 y 25445 (Fig. 13f). De esta manera, el análisis del sueño diurno y nocturno, reveló que la dieta restrictiva de nutrientes, afecta de distinta manera las líneas dependiendo de la etapa del ciclo luz-oscuridad.

Con el fin de analizar el estado de vigilia de los adultos de *Drosophila melanogaster*, analizamos la actividad total para ambos sexos y condiciones nutricionales. Las diferencias significativas se observaron en las líneas 25193, 25201, 25207 y 25210 en machos (Fig. 13g) y 25174, 25181, 25208, 25210, 25445 y 25744 para hembras (Fig. 13h).

Para explicar la disminución de sueño en algunas líneas, se estudiaron patrones asociados a los episodios de sueño (Fig. 14), entre ellos el número de

episodios de sueño, ya que la disminución se puede explicar a que los individuos duermen menos veces durante el ciclo diario. Esta medición se hizo tanto para sueño diurno (NESD), como para sueño nocturno (NESN). En machos se observaron diferencias significativas, en las líneas 25192 y 25744, para NESD (Fig. 14a) y 25445 para NESN (Fig.14c). En tanto, en hembras, la línea 25190 mostró una disminución significativa en el NESD (Fig. 14b). En el fenotipo NESN, 2 líneas mostraron un aumento significativo de este patrón, 25198 y 25445. Por su parte, la línea 25197, mostró una disminución significativa de este fenotipo ($p=0.02$) (Fig. 14d). Otro fenotipo estudiado fue la duración promedio de episodios de sueño, tanto para sueño diurno (PESD), como nocturno (PESN) (Anexo 2 a-d). En este fenotipo no se encontraron diferencias, excepto en la línea 25206 en machos en donde disminuyó la duración promedio de los episodios de sueño diurno ($p=0.01$). (Anexo 2 e). Para determinar el tiempo en que los individuos se demoraban en dormir, se midió el tiempo de latencia para ambas dietas y sexos. La línea 25201 mostró una disminución significativa del tiempo de latencia en machos y las líneas 25204 y 25445, mostraron una disminución significativa en la latencia en hembras (Anexo 2f).

Machos



◆ p<0.05
 ★ p<0.01
 ★ p<0.001

Figura 13: La restricción de nutrientes modifica los fenotipos de sueño diferencialmente entre hembras y machos adultos de líneas isogénicas de *Drosophila melanogaster*. Gris: Individuos en comida normal, Rojo: Individuos en restricción nutricional. El panel izquierdo muestra fenotipos de sueño para machos adultos de *Drosophila melanogaster*. El panel derecho muestra fenotipos de sueño para hembras adultas de *Drosophila melanogaster*.

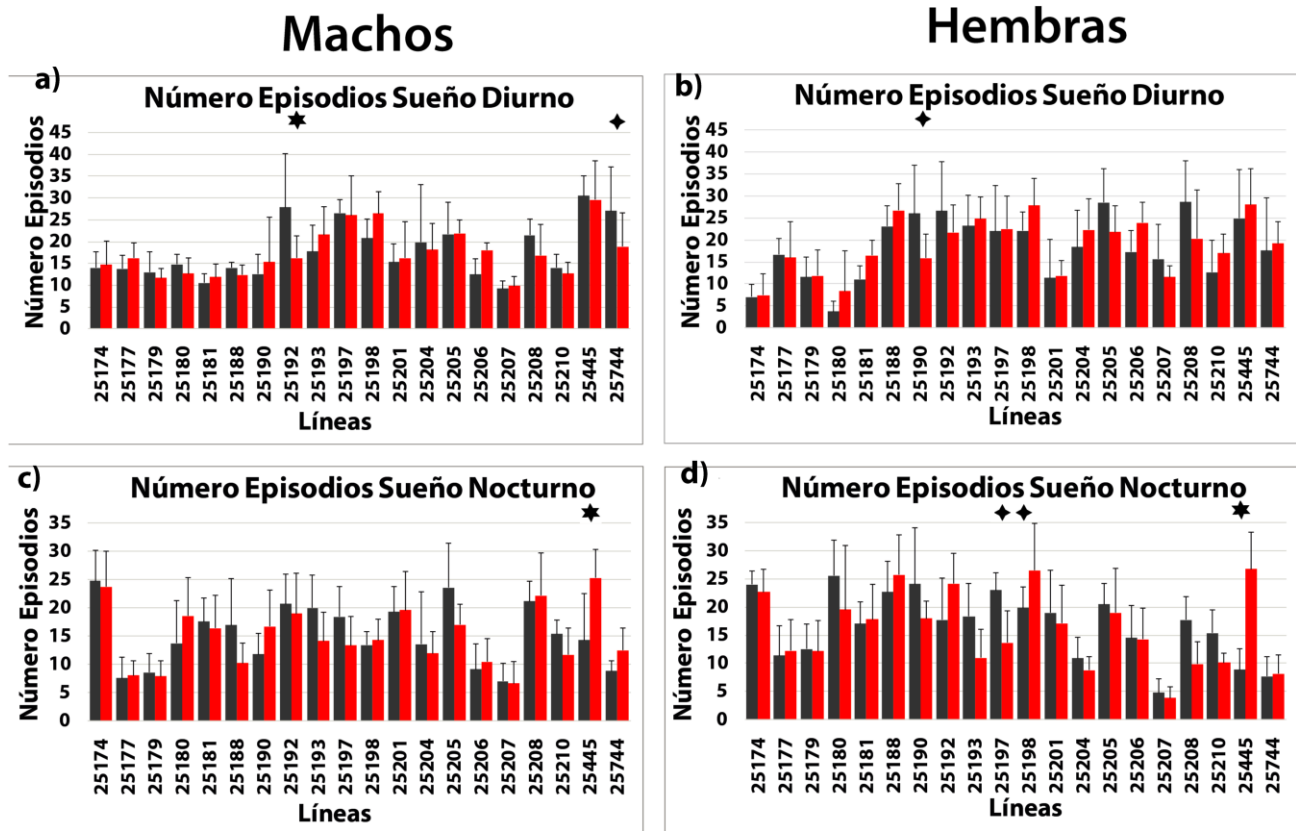


Figura 14: La disminución del sueño total en algunas líneas, se explica principalmente por el aumento en el número de episodios de sueño y a la disminución del tiempo de latencia en hembras y machos adultos de líneas isogénicas de *Drosophila melanogaster*. Gris: Individuos en comida normal, Rojo: Individuos en restricción nutricional. El panel izquierdo muestra fenotipos de sueño

para machos adultos de *Drosophila melanogaster*. El panel derecho muestra fenotipos de sueño para hembras adultas de *Drosophila melanogaster*.

3. Determinar efectos genéticos, nutricionales y de interacción en patrones de sueño entre las distintas líneas DGRP.

Con el fin de determinar los efectos del genotipo, la dieta, sexo y las interacciones de estas variables, se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) para cada fenotipo estudiado. Los resultados para los efectos marginales de los factores del Modelo 1 se muestran en la Tabla 7. Se observan que en todos los fenotipos existe una diferencia significativa entre las líneas. En el caso del efecto del sexo, se observa que todos los fenotipos estudiados a excepción de PESD ($p=0.06$) resultaron significativos por lo que presentan dimorfismo sexual. La dieta no afectó a todos los fenotipos estudiados, siendo las diferencias significativas en Sueño Total, sueño nocturno, actividad, PESN (0.006) y latencia. Los demás fenotipos no fueron significativamente diferentes. Los resultados del análisis de varianza para las interacciones entre los factores del Modelo 1 se muestran en la Tabla 8. Para el Sueño Total, resultaron significativas las interacciones por sexo, líneas y dieta, pero la interacción triple no tuvo significancia (Tabla 8a). En Sueño Diurno, todas resultaron significativas excepto la interacción triple (Tabla 8b). El fenotipo Sueño nocturno, mostró diferencias en todas las interacciones (Tabla 8c). El fenotipo de actividad, mostró significancia en la interacción entre $L \times S$ (Tabla 8d). La interacción $L \times S$ y $L \times D$ fueron significativas para NESD y NESN, así como también la interacción triple en ambos fenotipos (Tabla 8e-f). El fenotipo PESD mostró significancia para la

interacción *LxS* y *LxD*, no así en la interacción *SxD*, ni la interacción triple (Tabla 8g). La interacción *LxS* y *LxD*, fue significativa para el patrón PESN (Tabla 8h). Finalmente, la Latencia, mostró significancia en la interacción de los factores *LxS* y *LxD*. La interacción *SxD* y la interacción triple, no resultaron significativas (Tabla 8i).

Tabla 7: Promedios por fenotipo y valores de significancia de los efectos marginales de cada factor del modelo estadístico 1. En negrita se muestran los valores significativos

Fenotipo/Factor	Hembras		Machos		p value		
	D. Normal	Restricción	D. Normal	Restricción	<i>Dieta</i>	<i>Linea</i>	<i>Sexo</i>
a) Sueño Total	687.8±21	775.8±19.1	882±19	843±18	4.4e-08	3.4e-143	9.6e-41
b) S. Diurno	237.6±12.9	265±12.62	363.5±11	367.4±9	0.193	1.2e-135	4.7e-75
c) S. Nocturno	450.1±13.5	510.7±11	518.5±11	475.6±12.3	4.8e-15	9.2e-167	0.0008
d) Actividad	1.4±0.03	1.43±0.04	1.66±0.04	1.8±0.03	2.4e-05	3.2e-140	8.6e-35
e) NESD	18.44±0.09	18.45±0.1	17.4±0.06	17.9±0.16	0.7	5.5e-88	0.03
f) NESN	16.95±0.1	15.76±0.1	14.9±0.07	15.4±0.16	0.1	2.5e-89	0.0007
g) PESD	12.88±1.6	14.36±1.7	20.8±2.6	20.4±2.6	0.8	1.09e-15	2.6e-11
h) PESN	26.54±4	32.38±4.87	34.7±4.89	30.8±4.4	0.006	6.89e-86	0.06
i) Latencia	55.60±5.9	46.86±5.1	36.4±2.95	41.7±3.5	0.001	8.6e-114	2.5e-05

Tabla 8: Significancia de efectos de interacción entre línea, sexo y dieta para 9 fenotipos de sueño en 20 líneas isogénicas DGRP. En negrita se muestran los valores significativos.

Fenotipo/Factor	<i>LxS</i>	<i>LxD</i>	<i>DxS</i>	<i>LxDxS</i>
a) Sueño Total	5.5e-17	1.04e-1	0.004	0.2
b) Sueño Diurno	4.2e-12	9.8e-12	0.002	0.28
c) Sueño Nocturno	1.1e-19	1.5e-16	0.02	0.02
d) Actividad	5.4e-12	0.3	0.6	1.1
e) NESD	1.5e-6	8.5e-17	0.336	0.005
f) NESN	1.6e-16	7.4e-19	0.548	1.7e-05
g) PESD	0.023	5.1e-5	0.202	0.695
h) PESN	0.075	1.05e22	0.429	0.985
i) Latencia	0,002	1.4e-05	0.285	0.207

Luego, a partir del Modelo 2 se calcularon las varianzas para cada factor, para cada sexo (Tabla 9-10), para finalmente estimar la heredabilidad en sentido amplio para determinar en qué medida la varianza fenotípica de los patrones analizados depende de la varianza genética (Tabla 11). Se observaron heredabilidades en sentido amplio de moderadas a altas, cercanas a 0,5 Además, estimamos un componente de interacción genético-ambiental con la finalidad de determinar los efectos de la dieta según cada genotipo, por sobre el efecto marginal de la dieta. Los

resultados se muestran en la Tabla 11. Se realizó en análisis para cada fenotipo y sexo. El fenotipo que posee mayor heredabilidad en sentido amplio es el Sueño Nocturno en hembras (0.45), mientras que machos presentaron la mitad de esa heredabilidad (0.21). Además, nuestros resultados muestran que existen un efecto de interacción de genotipo y dieta para todos los fenotipos observados, excepto para los PESD en hembras y PESN en ambos sexos, que explica alrededor del 10% de la variabilidad fenotípica. El mayor índice del efecto de interacción genético-ambiental se observó para PESN en hembras (0.15).

Tabla 9. Valores de varianza para los factores del Modelo estadístico 2 por cada fenotipo en Machos

Fenotipo/Varianza	L	ε	$D \times L$
Sueño Total	23921	25994	41174
Sueno Diurno	6858	7974	976
Sueño Nocturno	10484	9662	1580
Actividad	0.1194	0.1336	0.0044
NESD	24.08	44.06	5.1531
NESN	17.1	38.17	6.61
PESD	109.1	162.1	13.66
PESN	791	2053	91
Latencia	605.7	996	38.18

Tabla 10: Valores de varianza para los factores del Modelo estadístico 2 por cada fenotipo en Hembras

Fenotipo/Varianzas	L	ε	DxL
Sueño Total	26181	31922	5171
Sueno Diurno	10799	13002	1726
Sueño Nocturno	10726	10589	2413
Actividad	0.093	0.1198	0.024
NESD	30.7	65.47	6.5
NESN	20.39	43.11	11.94
PESD	21.28	1110	13
PESN	4609	7362	0
Latencia	1914	2808	121.7

Tabla 11: Heredabilidad en sentido amplio e índice de interacción genético-ambiental para fenotipos del sueño de 10 líneas isogénicas sometidas a restricción nutricionales prenatal.

Fenotipo	Sexo	H^2	I^2
Sueño Total	M	0.44	0.08
	H	0.41	0.08
Sueño Diurno	M	0.43	0.07
	H	0.42	0.07
Sueño Nocturno	M	0.48	0.07
	H	0.45	0.10
Actividad	M	0.46	0.02
	H	0.39	0.10
NESD	M	0.32	0.07
	H	0.29	0.06
NESN	M	0.28	0.11
	H	0.27	0.15
PESD	M	0.38	0.05
	H	0.01	0.00
PESN	M	0.27	0.00
	H	0.40	0.00
Latencia	M	0.37	0.02
	H	0.4	0.03

Discusión.

Nuestros resultados muestran que una dieta restrictiva de nutrientes modifica 6 de 9 patrones de sueño analizados en hembras y en 5 de 9 fenotipos analizados en machos. Se puede realizar el análisis de los fenotipos en dos grupos, los asociados a tiempo de sueño, y los asociados a episodios de sueño. Se observa en general que las diferencias de tiempo de sueño tanto diurno como nocturno en una población DGRP, se explican por diferencias en la duración promedio de los episodios de sueño y no así por diferencias en el número de episodios de sueño. Así también, se observa una variación fenotípica de los patrones de sueño en ambos sexos y condiciones, dado el distinto fondo genético de las líneas. Esto concuerda con el estudio realizado por (Harbison *et al.* 2013), en donde los fenotipos del sueño poseían una variación natural dada por el genotipo.

Por otra parte, nuestros resultados comprueban que el genotipo modifica el efecto de una dieta de restricción nutricional prenatal en 9 patrones del sueño analizados. Existe una respuesta diferencial de las líneas al estrés durante el desarrollo producido por una dieta restrictiva de nutrientes. Se observan algunas líneas en las cuales las diferencias son significativas, ya sea un aumento o disminución del fenotipo estudiado y otras líneas en que no existen diferencias. Esto confirma que diferentes genotipos resultan en consecuencias diferenciales del comportamiento a un cambio en la nutrición prenatal.

Al realizar el análisis de ANOVA, observamos que existe una interacción entre el genotipo y el sexo para todos los fenotipos estudiados. Con respecto a la interacción entre la dieta y las líneas estudiadas, se observaron interacciones

significativas para 8 fenotipos, excepto la actividad. La interacción $D \times S$, mostró valores significativos para el sueño total, sueño diurno y sueño nocturno, no así para los otros fenotipos analizados. Cuando se realiza el análisis de la interacción triple, se observan valores significativos para el sueño nocturno, NESD y NESN. No se observa una interacción significativa para otros fenotipos.

El análisis de heredabilidad, reveló que existen patrones de sueño en donde la varianza fenotípica depende en gran medida de la varianza genotípica, como es el caso del sueño total, sueño diurno, y sueño nocturno en hembras. Además, se observan diferencias en la heredabilidad en algunos fenotipos entre machos y hembras, teniendo alta heredabilidad en un sexo y baja en el otro. Sueño nocturno en machos tiene una heredabilidad de 0.21, mientras que en hembras es de 0.45. Lo mismo se observa en PESD en donde en los machos se observa una alta heredabilidad 0.38 y en hembras la heredabilidad es baja o nula, 0.01. Las diferencias en el resto de los fenotipos dependen principalmente de la variación ambiental. Los resultados de nuestro experimento son similares a los obtenidos por (Harbison *et al.* 2013), en donde se estimó la H^2 , para el sueño nocturno, el sueño diurno, NESN, NESD, PESN, PESD y la actividad fueron $H^2 = 0,54$ $H^2 = 0,42$, $H^2 = 0,33$, $H^2 = 0,38$, $H^2 = 0,19$ y $H^2 = 0,39$. Si bien estas heredabilidades son para ambos sexos en conjunto, los valores mayores son similares a los nuestros, cercanos a 0.5.

Los resultados de la determinación del índice de interacción genético-ambiental, mostraron que existe una incidencia de la varianza de interacción entre el genotipo y la dieta, en la variación fenotípica de los patrones de sueño

estudiados, a excepción de PESD, y PESN en machos en donde el valor es 0. En el resto de los fenotipos los valores del índice de interacción genético-nutricional, se encuentran cercano a 0.1, a excepción de la Actividad en machos. El índice de interacción más alto se observó en el fenotipo NESN, en donde en machos fue de 0.11 y 0.15 en hembras. Estos datos sugieren que la interacción genético-nutricional prenatal juega un rol en las diferencias en los patrones de sueño de *Drosophila* debido a una malnutrición prenatal, explicando hasta el 15% de la variación fenotípica en patrones del sueño.

Durante el desarrollo del sistema nervioso de *Drosophila melanogaster* es posible identificar etapas dependientes de la dieta que requieren aminoácidos producidos a partir de la dieta. Cuando se someten larvas a una dieta restrictiva de nutrientes, se afecta la etapa proliferativa, la cual consiste en aumentar el número de células neurales progenitoras, para permitir que exista un número normal de células que posteriormente se van a diferenciar en glías y neuronas referencia. Estos tipos celulares conformarán las diversas estructuras que permiten a *Drosophila* desenvolverse en el ambiente y además controlan los diversos comportamientos asociados a esta especie (Lanet and Maurange 2014). Es esperable que estos cambios morfológicos asociados a una mala alimentación afecten las conductas y comportamientos propios de las moscas. Sin embargo, el fondo genético de los individuos juega un papel importante en los efectos en el comportamiento de este tipo de dieta. En esta tesis hemos observado que los patrones de sueño se ven afectadas de distinta manera en las líneas analizadas. Hemos realizado el análisis de sueño diurno y nocturno por separado, debido a

que en *Drosophila melanogaster* se regula el diurno y nocturno por diferentes estructuras (Potdar and Sheeba 2013). De esta manera, el fondo genético modifica el efecto de la dieta de distinta forma en estos 2 fenotipos en las líneas analizadas. Además, realizamos la medición de otros fenotipos, con el fin de determinar el origen de la diferencia significativa en sueño total. Al realizar la descomposición del sueño total en diurno y nocturno, observamos que el principal componente que se modifica en las líneas estudiadas es el sueño nocturno. En la literatura, está reportado que si bien, están definidos los mecanismos que controlan el sueño, existen diferentes combinaciones de inhibiciones y activaciones que controlan tanto el sueño diurno, como el sueño nocturno (Potdar and Sheeba 2013). Con esto, y basándonos en nuestros resultados, sostenemos que el principal efecto de una restricción nutricional prenatal, afecta principalmente a estructuras y mecanismos relacionados con el control del sueño nocturno. De la misma manera, estudiamos fenotipos relacionados al número de episodios de sueño y latencia, con el fin de determinar otra causa probable a la diferencia significativa en los tiempos de sueño. Los resultados muestran, que principalmente la diferencia se debe a que los individuos duermen más veces durante el ciclo de 24 horas, eso debido a que disminuyen el tiempo de latencia, es decir, demoran menos tiempo en comenzar una nueva siesta, por lo que duermen más veces durante el día y la noche.

Están descritas diferentes alteraciones fisiológicas en las estructuras cerebrales de *Drosophila melanogaster*. Existen diferencias en el grosor de los lóbulos α y β de los MB, además de casos en que existe pérdida de algún lóbulo

(Zwarts *et al.* 2015). En nuestro laboratorio (datos no mostrados), se han observado estos mismos fenotipos, asociados a cambios en la nutrición, lo que podría explicar las diferencias en los patrones de sueño analizados en esta tesis. Por ejemplo, la línea 25445, la cual presenta las mayores diferencias entre ambas dietas, muestra alteraciones morfológicas en el MB. Además, esta misma línea presenta diferencias significativas en otros comportamientos analizados, como Climbing (geotaxis negativa y actividad motora) y Startle (tiempo de recuperación a una perturbación mecánica). Otras líneas no mostraron ninguna diferencia significativa, lo que se puede asociar a un efecto protector del genotipo.

Es necesario realizar nuevos estudios para comprender los mecanismos y moléculas que interactúan en estos procesos, debido a que la explicación fisiológica para los cambios en los patrones del sueño debido a una dieta, pueden deberse a cambios en la expresión génica, morfología, actividad metabólica y otros mecanismos.

Conclusiones

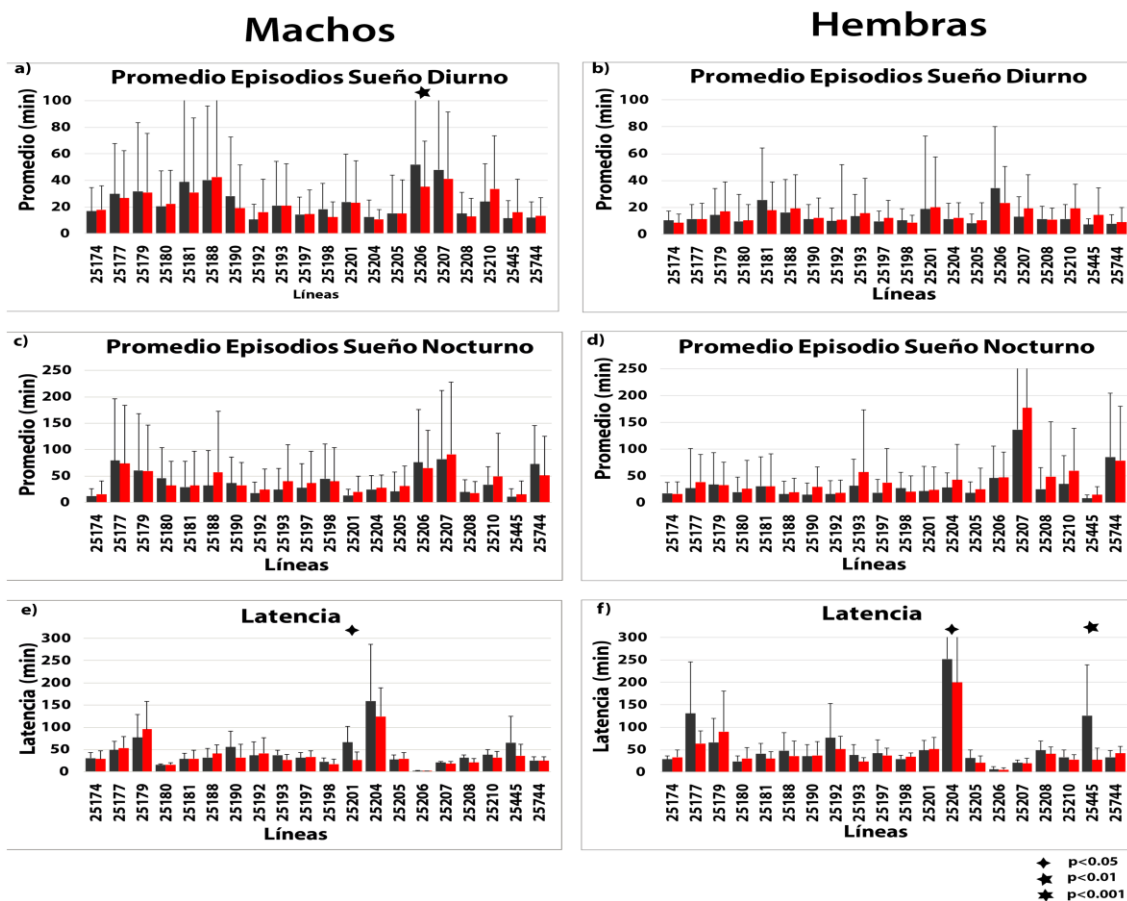
- Una dieta prenatal restrictiva de nutrientes modifica fenotipos de sueño en machos y hembras adultos.
- Existe una variación fenotípica dada por el distinto fondo genético para nivel de actividad y patrones de sueño evidenciadas en heredabilidades moderadas.
- La interacción entre el genotipo y la dieta tiene efectos bajos pero significativos en diferencias de patrones de sueño entre moscas adultas, demostrando que la respuesta frente a un cambio en el ambiente depende del genotipo de los individuos.

Anexos

Anexo 1. Líneas de DGRP pertenecientes al subgrupo Core 40. Cada número corresponde al código para cada línea.

25174	25177	25179	25180	25181
25188	25190	25192	25193	25197
25198	25201	25201	25204	25205
25206	25207	25208	25210	25744

Anexo 2: El promedio de los episodios de sueño, no tienen mayor efecto en las diferencias del sueño total, pero si la latencia en hembras y machos adultos de líneas isogénicas de *Drosophila melanogaster*. Gris: Individuos en comida normal, Rojo: Individuos en restricción nutricional. El panel izquierdo muestra fenotipos de sueño para machos adultos de *Drosophila melanogaster*. El panel derecho muestra fenotipos de sueño para hembras adultas de *Drosophila melanogaster*.



Bibliografía

1. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ayroles J. F., Carbone M. A., Stone E. a, Jordan K. W., Lyman R. F., *et al.*, 2009
Systems of Complex Genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 41: 299–307.
- Bass T. M., Grandison R. C., Wong R., Martinez P., Partridge L., *et al.*, 2015 Europe
PMC Funders Group Optimization of Dietary Restriction Protocols in *Drosophila*.
62: 1071–1081.
- Breslau N., Roth T., Rosenthal L., Andreski P., 1996 Sleep disturbance and psychiatric disorders: A longitudinal epidemiological study of young adults. *Biol. Psychiatry* 39: 411–418.
- Calcagno B., Eyles D., Alphen B. van, Swinderen B. van, 2013 Transient activation of dopaminergic neurons during development modulates visual responsiveness, locomotion and brain activity in a dopamine ontogeny model of schizophrenia. *Transl. Psychiatry* 3: e206.
- Cirelli C., Bushey D., 2008 Sleep and Wakefulness in *Drosophila melanogaster*. *Ann. New York Acad.*: 323–329.
- Cirelli C., Tononi G., 2008 Is sleep essential? *PLoS Biol.* 6: 1605–1611.
- Clair D. St., He L., 2005 Rates of Adult Schizophrenia Following Prenatal Exposure to the Chinese Famine of 1959-1961. *Jama* 294: 557–562.
- Cvetkovic-lopes V., Bayer L., Dorsaz S., Maret S., Pradervand S., *et al.*, 2010

- Elevated Tribbles homolog 2–specific antibody levels in narcolepsy patients. 120: 713–719.
- Dauvilliers Y., Blouin J. L., Neidhart E., Carlander B., Eliaou J. F., *et al.*, 2004 A narcolepsy susceptibility locus maps to a 5Mb region of chromosome 21q. *Ann. Neurol.* 56: 382–388.
- Foltényi K., Greenspan R. J., Newport J. W., 2007 Activation of EGFR and ERK by rhomboid signaling regulates the consolidation and maintenance of sleep in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 10: 1160–7.
- Furukubo-Tokunaga K., 2009 Modeling schizophrenia in flies. *Prog. Brain Res.* 179: 107–115.
- Gottlieb D. J., DeStefano A. L., Foley D. J., Mignot E., Redline S., *et al.*, 2004 APOE 4 is associated with obstructive sleep apnea/hypopnea: The Sleep Heart Health Study. *Neurology* 63: 664–668.
- Gottlieb D. J., O'Connor G. T., Wilk J. B., 2007 Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC Med. Genet.* 8 Suppl 1: S9.
- Harbison S. T., McCoy L. J., Mackay T. F. C., 2013 Genome-wide association study of sleep in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* 14: 281.
- Huber R., Hill S. L., Holladay C., Biesiadecki M., Tononi G., *et al.*, 2004 Sleep homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Sleep* 27: 628–639.
- Kawashima M., Lin L., Tanaka S., Jennum P., Knudsen S., *et al.*, 2010 Anti-Tribbles homolog 2 (TRIB2) autoantibodies in narcolepsy are associated with recent onset of cataplexy. *Sleep* 33: 869–74.
- Kornum B. R., Kawashima M., Faraco J., Lin L., Rico T. J., *et al.*, 2011 Common variants in P2RY11 are associated with narcolepsy. *Nat. Genet.* 43: 66–71.

- Lanet E., Maurange C., 2014 Building a brain under nutritional restriction: Insights on sparing and plasticity from *Drosophila* studies. *Front. Physiol.* 5 MAR: 1–9.
- Lim A. S., Scammell T. E., 2010 The trouble with Tribbles: do antibodies against TRIB2 cause narcolepsy? *Sleep* 33: 857–858.
- Liu C., Haynes P. R., Donelson N. C., Aharon S., Griffith L. C., 2015 Sleep in Populations of *Drosophila Melanogaster*. *eNeuro* 2: ENEURO.0071-15.2015.
- Lumey L. H., Stein A. D., Susser E., 2011 Prenatal famine and adult health. *Annu. Rev. Public Health* 32: 237–62.
- Mackay T. F. C., Richards S., Stone E. a, Barbadilla A., Ayroles J. F., *et al.*, 2012 The *Drosophila melanogaster* Genetic Reference Panel. *Nature* 482: 173–8.
- Masek P., Keene A. C., 2012 Dopamine: On the threshold of sleep. *Curr. Biol.* 22: 1–4.
- Pack A. I., Pien G. W., 2011 Update on sleep and its disorders. *Annu. Rev. Med.* 62: 447–460.
- Potdar S., Sheeba V., 2013 Lessons From Sleeping Flies : Insights from *Drosophila melanogaster* on the Neuronal Circuitry and Importance of Sleep. *Journal of Neurogenetics* 27: 23–42.
- Rapoport J. L., Giedd J. N., Gogtay N., 2012 Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Mol. Psychiatry* 17: 1228–38.
- Rehn A. E., Buuse M. Van Den, Copolov D., Briscoe T., Lambert G., *et al.*, 2004 An animal model of chronic placental insufficiency: Relevance to neurodevelopmental disorders including schizophrenia. *Neuroscience* 129: 381–391.
- Rooij S. R. de, Wouters H., Yonker J. E., Painter R. C., Roseboom T. J., 2010 Prenatal undernutrition and cognitive function in late adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 16881–6.

- Schormair B., Kemlink D., Roeske D., Eckstein G., Xiong L., *et al.*, 2008 PTPRD (protein tyrosine phosphatase receptor type delta) is associated with restless legs syndrome. *Nat. Genet.* 40: 946–948.
- Sehgal A., Mignot E., 2011 Genetics of Sleep and Sleep disorders. *Cell* 146: 197–207.
- Shao L., Shuai Y., Wang J., Feng S., Lu B., *et al.*, 2011 Schizophrenia susceptibility gene dysbindin regulates glutamatergic and dopaminergic functions via distinctive mechanisms in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 18831–6.
- Shaw P. J., Cirelli C., 2000 Correlates of Sleep and Waking in *Drosophila melanogaster*. 287: 1834–1837.
- Spéder P., Liu J., Brand A. H., 2011 Nutrient control of neural stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23: 724–729.
- Toyoda H., Tanaka S., Miyagawa T., Honda Y., Tokunaga K., *et al.*, 2010 Anti-Tribbles homolog 2 autoantibodies in Japanese patients with narcolepsy. *Sleep* 33: 875–8.
- Ueno T., Tomita J., Tanimoto H., Endo K., Ito K., *et al.*, 2012 Identification of a dopamine pathway that regulates sleep and arousal in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 15: 1516–1523.
- Winkelmann J., Schormair B., Lichtner P., Ripke S., Xiong L., *et al.*, 2007 Genome-wide association study of restless legs syndrome identifies common variants in three genomic regions. *Nat. Genet.* 39: 1000–1006.
- Xu M. Q., Sun W. S., Liu B. X., Feng G. Y., Yu L., *et al.*, 2009 Prenatal malnutrition and adult Schizophrenia: Further evidence from the 1959-1961 chinese famine. *Schizophr. Bull.* 35: 568–576.
- Young M. W., 2004 The Tick-Tock of the Biological Clock.

Zimmerman J. E., Chan M. T., Jackson N., Maislin G., Pack A. I., 2012 Genetic background has a major impact on differences in sleep resulting from environmental influences in *Drosophila*. *Sleep* 35: 545–57.

Zwarts L., Broeck L. Vanden, Cappuyens E., Ayroles J. F., Magwire M. M., *et al.*, 2015 The genetic basis of natural variation in mushroom body size in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Commun.* 6: 10115.