

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES  
OCTOPAMINÉRGICOS Y MUSCARÍNICOS DE LÓBULO  
ANTENAL, EN EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN  
OLFATIVA EN DROSOPHILA MELANOGASTER***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en  
toxicología y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

***VICENTE ANDRÉS LEYTON MIRANDA***

**Directores de Tesis:**

**Dr. Jorge Campusano Astorga**

**Dra. Jenny Fiedler Temer**

**Santiago-CHILE**

**2018**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

## VICENTE ANDRÉS LEYTON MIRANDA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y diagnóstico molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_

**Director de Tesis:**

**Dr. Jorge Campusano Astorga** \_\_\_\_\_

**Co-directora de Tesis:**

**Dra. Jenny Fiedler Temer** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Alfonso Paredes Vargas** \_\_\_\_\_

**Dra. Ximena Sierralta Jara** \_\_\_\_\_

**Dr. Mario Chiong Lay** \_\_\_\_\_

## **Agradecimientos.**

Quiero agradecer a toda la comunidad docente de la Universidad De Chile que permitió y contribuyó en mi formación como científico, en especial a la Dra. Jenny Fiedler por su entrega, dedicación, rigurosidad y cariño, que permitió generar en mí la motivación necesaria para seguir en este duro camino de ser científico y hacer ciencia en Chile. De manera especial quiero agradecerle al Dr. Jorge Campusano Astorga de la PUC por haberme recibido de la mejor manera en su laboratorio y haberme permitido ser parte de un grupo de científicos de muy buen nivel, gracias por haberme formado, guiado y por haber confiado en mí. Gracias también a cada uno de los integrantes del laboratorio de Neurogenética De La Conducta por la grata convivencia que aportan día a día y por la generosidad que disponen para hacer del laboratorio un lugar de real cooperación y trabajo.

Gracias también a la selección de escalada de la Universidad de Chile, que estuvo presente en cada uno de los procesos.

Gracias a mi familia, a mis padres de manera especial por haberse mantenidos juntos como matrimonio, a pesar de sus diferencias; sin duda esto es algo que muy pocos logran, amarse de verdad y transmitirme esa forma de amar, donde el otro es lo mas importante, gracias por haberme enseñado a poner al otro antes que yo; gracias por haberme formado y permitirme haber llegado hasta aquí, gracias por haberme transmitido la fé. Finalmente gracias a todos quienes forman parte de mi vida, amigos y amigas, hermanos y hermana, tíos y tías, pollito, abuelos y abuelitas, etc. Porque de alguna u otra manera han contribuido en mi formación como persona.

"The scientists of today think deeply instead of clearly. One must be sane to think clearly, but one can think deeply and be quite insane."  
Nikola Tesla

### **Financiamiento.**

Los recursos disponibles para realizar esta tesis están dentro de los márgenes asignados para el proyecto Regular FONDECYT Regular 1141233, titulado “Contribution Of Metabotropic Receptors For Biogenic Amines And Acetylcholine To Olfactory Function In Drosophila Melanogaster” con fecha de inicio: 01-03-2014 y fecha termino: 01-03-2018. Del cual el investigador principal es el Dr. Jorge Campusano.

### **Presentaciones a congreso.**

- 2016. Poster “Calcium responses generated by aminergic and cholinergicsystems in Drosophila central nervous system neurons” presentado en curso Small Brains, big ideas. Valparaiso, Chile, noviembre 2016.
- 2017. Poster “Study of the cholinergic and octopaminergic signals contributing to olfactory information processing in Drosophila melanogaster Antennal Lobe” presentado en XIII congreso de la Sociedad Chilena de Neurociencia, Castro, Chile 1-3 octubre 2016.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.	viii
ÍNDICE DE TABLAS.	ix
ABREVIATURAS.	x
RESUMEN.	xi
ABSTRACT	xiii
<b>1. Introducción.</b>	<b>1</b>
1.1. Los sistemas sensoriales y nuestra relación con el entorno. Importancia del sistema olfativo.	1
1.2. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo experimental.	3
1.2.1. Sistema UAS/GAL4.	4
1.3. Descripción del sistema olfativo de <i>Drosophila melanogaster</i> .	7
1.3.1. Homología con vertebrados.	7
1.3.2. Integración de la información sensorial olfativa en <i>Dm</i> .	11
1.3.3. Neuroquímica del sistema olfatorio de <i>Dm</i> .	13
1.3.3.1. Acetilcolina y receptores colinérgicos.	13
1.3.3.2. Aminas Biogénicas.	14
1.3.3.3. Señalización de receptores de aminas biogénicas.	18
<b>2. Hipótesis del trabajo.</b>	<b>22</b>
<b>3. Objetivos.</b>	<b>22</b>
3.1. Objetivo general.	22
3.2. Objetivos específicos.	23
3.2.1. Analizar las dinámicas de calcio intracelular asociadas a la activación de receptores muscarínicos en LA.	23
3.2.2. Analizar las dinámicas de calcio intracelular asociadas a la activación de receptores octopaminérgicos en LA.	23
3.2.3. Analizar la participación de receptores OctB3 y mACh-A	

de Lóbulo antenal, en el procesamiento de información olfativa.	23
<b>4. Materiales y métodos.</b>	24
4.1. Cuidado y mantenimiento de las moscas.	24
4.2. Cepas de Drosophila y cruzas.	25
4.3. Montaje y visualización de cerebros completos de Dm, bajo microscopio Confocal o Spinning disc.	26
4.4. Cultivos primarios de neuronas de mosca.	28
4.5. Imágenes de calcio.	29
4.6. Medición AMPc intracelular en cultivos primarios de cerebro de Dm.	34
4.7. Experimentos conductuales.	35
4.8. Análisis de datos.	38
4.9. Bioseguridad.	39
<b>5. Resultados.</b>	40
5.1. Evaluación y selección de drivers de expresión para poblaciones neuronales de LA.	40
<b>5.2. Objetivo específico 1.</b> Analizar las dinámicas de calcio intracelular asociadas a la activación de receptores muscarínicos de LA.	42
5.2.1. Respuestas de calcio intracelular en NLs de LA mediadas por Acetilcolina.	42
5.2.2. Respuestas de calcio intracelular en NPs de LA mediadas por Acetilcolina.	43
5.2.3. Neuronas de proyección y locales de lóbulo antenal, manejan distintamente los niveles de calcio intracelular frente a un estímulo de acetilcolina.	46
<b>5.3. Objetivo específico 2.</b> Analizar las dinámicas de calcio intracelular asociadas a la activación de receptores octopaminérgicos en LA.	47
5.3.1. Análisis de cambios en los niveles de calcio intracelular en respuesta a octopamina en NLs y NPs de LA.	47

5.4. <b>Objetivo específico 3.</b> Analizar la participación de receptores OctB3 y mACh de Lóbulo antenal, en el procesamiento de información olfativa.	52
5.4.1. Análisis de la participación de OctB3R en el procesamiento de la información olfativa, en distintas poblaciones neuronales de LA.	63
5.4.2. Análisis de la participación de mAChRs en el procesamiento de la información olfativa, en distintas poblaciones neuronales de LA.	56
<b>6. Discusión.</b>	58
6.1. Experimentos de imágenes de calcio.	58
6.1.1. Acetilcolina produce cambios en los niveles de calcio Intracelular en NPs mediadas por mAChR y nAChR	58
6.1.2. Acetilcolina produce cambios en los niveles de calcio intracelular en NLs de LA mediadas por mAChR y probablemente nAChR.	59
6.1.3. Neuronas de proyección y locales de lóbulo antenal, manejan diferencialmente los niveles de calcio intracelular frente a un estímulo de acetilcolina.	60
6.1.4. Octopamina no modula los niveles de calcio intracelular en LA de Dm.	61
6.2. Experimentos conductuales.	62
6.2.1. mAChRs no participan en el procesamiento de la información olfatoria a nivel de NPs y NLs.	63
6.2.2. OctB3R de PNs, participa en el procesamiento de información olfativa aversiva, no así en NLs.	64
<b>7. Conclusión.</b>	65
<b>8. Proyecciones</b>	66
<b>9. Bibliografía.</b>	68

## Índice de figuras.

Figura 1: Sistema GAL4/UAS para expresión modular de transgenes en tejidos específicos.	6
Figura 2: Comparación de la organización del sistema sensorial olfatorio de mamíferos e invertebrados.	9
Figura 3: Fuentes intrínsecas y extrínsecas de neuromodulación en el sistema olfatorio de insectos y vertebrados.	17
Figura 4: Microfotografía fluorescente que muestra la actividad del enhancer de OctB3R.	20
Figura 5: Pupas de <i>Drosophila melanogaster</i> divididas en 3 estadios, ordenados cronológicamente	25
Figura 6: Esquema en etapas del protocolo utilizado para la realización de imágenes de calcio, en cultivos primarios de cerebro de <i>Dm</i> .	31
Figura 7: Diagrama esquemático del biosensor de AMPc basado en la proteína Epac.	35
Figura 8: T-maze.	38
Figura 9: Expresión de GFP y Tomato, en distintas poblaciones neuronales de lóbulo antenal.	41
Figura 10: Activación colinérgica en NLs de lóbulo antenal.	43
Figura 11: Respuestas a Acetilcolina dependen parcialmente de la activación de receptores nicotínicos en NPs.	45
Figura 12: Respuestas diferenciales a acetilcolina de las dos subpoblaciones de neuronas de LA.	47
Figura 13: Activación octopaminérgica en diferentes poblaciones neuronales de lóbulo antenal.	49
Figura 14: Comparación de la expresión de EPAC en cultivos primarios de <i>Drosophila</i> .	50
Figura 15: Respuestas de calcio intracelular en neuronas de proyección de lóbulo antenal.	51



Figura 16: No se aprecian cambios en ensayo de aversión a benzaldehído en moscas mutantes para el receptor de octopamina beta 3 (OctB3R).	54
Figura 17: Ensayo de aversión a benzaldehído 0.1%, en moscas que dirigen la expresión de un RNAi para OctB3R en distintas poblaciones neuronales de lóbulo antenal.	55
Figura 18: Ensayo de aversión a benzaldehído 0.1%, en moscas que dirigen la expresión de un RNAi para mAChR-A en distintas poblaciones neuronales de lóbulo antenal.	57
Figura 19: Curvas de los niveles de calcio intracelular en dos poblaciones neuronales de LA.	61

#### **Índice de tablas.**

Tabla 1: Análisis de la expresión relativa de receptores de octopamina.	21
Tabla 2: Cepas Gal4, UAS, mutantes y controles utilizados.	27
Tabla 3: Fármacos utilizados durante los experimentos de imágenes de calcio.	32
Tabla 4: Grupos experimentales utilizados en los experimentos conductuales.	37

## Abreviaturas.

5HT: Serotonina.

ABs: Aminas biogénicas.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

BO: Bulbo olfatorio.

Bz: Benzaldehído.

CFP: Proteína fluorescente cian.

CFs: Cuerpos fungiformes.

DA: Dopamina.

*Dm: Drosophila melanogaster.*

EPAC: Proteína de intercambio directamente activada por AMPc.

FRET: Transferencia de energía entre fluorocromos.

GFP: Proteína fluorescente verde.

LA: Lóbulo antenal.

mAChR: Receptor muscarínico sensible a acetilcolina.

MT: Neuronas mitrales/Tufted.

nAChR: receptores nicotínicos de acetilcolina sensibles a  $\alpha$ -BTX.

NLs: Neuronas locales.

NPs: Neuronas de proyección.

NROs: Neuronas receptoras de odorantes.

OA: Octopamina.

OctB3R: Receptor de octopamina beta 3.

PBS: Tampón fosfato salino.

QNB: Bencilato de 3 quinuclidinilo.

ROs: Receptores de odorantes.

SNC: Sistema nervioso central.

YFP: Proteína fluorescente amarilla.

## Resumen.

La capacidad de descifrar señales de olores es fundamental en la vida de los animales, ya que les permite interactuar entre sí y generar recuerdos de entornos beneficiosos o peligrosos para su supervivencia. La organización del sistema olfatorio es similar en un amplio rango de especies, que van desde invertebrados hasta mamíferos. Distintos grupos de investigadores han avanzado en la comprensión de los principios biológicos que rigen los comportamientos asociados a señales olfativas, mediante el estudio de modelos animales más simples, como la mosca *Drosophila melanogaster*. Una de las primeras zonas del cerebro de mosca en procesar información olfativa es el lóbulo antenal (LA); esta es una estructura del cerebro que comparte varias características con el bulbo olfatorio de vertebrados y que contiene dos poblaciones neuronales: las neuronas locales (NLs) y de proyección (NPs). Son estas últimas las que transmiten la información olfativa hacia centros superiores. Poco se sabe de los procesos celulares que se llevan a cabo en lóbulo antenal y el rol que puedan cumplir tales mecanismos en el procesamiento de información olfativa. Sin embargo, en lóbulo antenal es posible encontrar inervación de distintos tipos neuronales, incluyendo aminas biogénicas como serotonina y octopamina, que se sabe que participan en procesos de formación de memoria apetitiva y/o aversiva en zonas superiores del cerebro. Interesantemente, octopamina posee un receptor altamente expresado en lóbulo antenal, OctB3R, del cual poco se sabe respecto a su participación en el procesamiento de información olfativa. Por otro lado, recientemente se ha

descrito que receptores metabotrópicos de acetilcolina participan en procesos de memoria aversiva, en regiones superiores del cerebro de *Drosophila* y se ha reportado su expresión en LA.

En esta tesis se estudiaron los mecanismos moleculares de señalización activados por estos receptores en neuronas de proyección y neuronas locales de lóbulo antenal y su contribución al procesamiento de información olfativa en *Drosophila*. La hipótesis propone que las dinámicas de calcio intracelular asociadas a la activación de receptores muscarínicos de acetilcolina de tipo A (mAChR-A) y octopaminérgicos beta 3 (OctB3R), de lóbulo antenal, contribuyen al procesamiento de olores en *Drosophila*. El objetivo general fue evaluar cambios en los niveles de calcio intracelular, posterior a la activación de receptores muscarínicos y octopaminérgicos de diferentes poblaciones neuronales de lóbulo antenal, frente a antagonistas y/o agonistas de ambos receptores. Se propuso evaluar además la contribución de estos receptores al procesamiento de olores en *Drosophila*. Se comprobó que OctB3R de NPs es importante en el procesamiento de información olfatoria aversiva, no así mAChR-A. Sin embargo, acetilcolina es capaz de producir cambios en los niveles de calcio intracelular en NPs y NLs, mediados por la activación de mAChR, contrario a lo que se observó cuando se estimularon NPs y NLs con OA, donde no se vieron cambios aparentes. En su conjunto, los resultados de este trabajo muestran la importancia de receptores asociados a efectos neuromoduladores, sobre la

actividad de distintas poblaciones neuronales de LA, en un contexto que contribuye a la codificación de señales odorantes.

### **Abstract.**

The ability to decipher signs of odors is fundamental in the life of animals, since it allows them to interact with each other and generate memories of beneficial or dangerous environments for their survival. The organization of the olfactory system is similar in a wide range of species, ranging from invertebrates to mammals. Different researchers have advanced in the understanding of the biological principles that govern the behaviors associated with olfactory signals, through the study of simpler animal models, such as the fly *Drosophila melanogaster*. One of the first areas of the fly brain to process olfactory information is the antennal lobe (LA); This is a structure of the brain that shares several characteristics with the olfactory bulb of vertebrates and that contains two neuronal populations: local neurons (NLs) and projection (NPs). It is the latter that transmit the olfactory information to higher centers. Little is known about the cellular processes that are carried out in the antennal lobe and the role that such mechanisms can play in the processing of olfactory information. However, in the antennal lobe it is possible to find innervation of different neuronal types, including biogenic amines such as serotonin and octopamine, which are known to participate in processes of appetitive and / or aversive memory formation in higher brain areas. Interestingly, octopamine has a receptor highly expressed in antennal

lobe, OctB3R, of which little is known about its participation in the processing of olfactory information. However, in the antennal lobe it is possible to find innervation of different neuronal types, including biogenic amines such as serotonin and octopamine, which are known to participate in processes of appetitive and / or aversive memory formation in higher brain areas. Interestingly, octopamine has a receptor highly expressed in antennal lobe, OctB3R, of which little is known about its participation in the processing of olfactory information. On the other hand, it has recently been described that metabotropic acetylcholine receptors participate in aversive memory processes in upper regions of the *Drosophila* brain and their expression in LA has been reported.

In this thesis we studied the molecular mechanisms of signaling activated by these receptors in projection neurons and local antennal lobe neurons and their contribution to the processing of olfactory information in *Drosophila*. The hypothesis proposes that the intracellular calcium dynamics associated with the activation of muscarinic acetylcholine receptors of type A (mAChR-A) and octopaminergic beta 3 (OctB3R), of antennal lobe, contribute to the processing of odors in *Drosophila*. The general objective was to evaluate changes in intracellular calcium levels, after the activation of muscarinic and octopaminergic receptors of different neuronal populations of antennal lobe, against antagonists and / or agonists of both receptors. It was also proposed to evaluate the contribution of these receptors to the processing of odors in *Drosophila*. It was found that OctB3R of NPs is important in the processing of aversive olfactory

information, not mAChR-A. However, acetylcholine is capable of producing changes in intracellular calcium levels in NPs and NLs, mediated by the activation of mAChR, contrary to what was observed when NPs and NLs were stimulated with OA, where no apparent changes were seen. As a whole, the results of this work show the importance of receptors associated with neuromodulatory effects, on the activity of different neuronal populations of LA, in a context that contributes to the coding of odorant signals.

## **1. Introducción**

### **1.1 Los sistemas sensoriales y nuestra relación con el entorno. Importancia del sistema olfativo.**

La capacidad de reconocer las propiedades y características del entorno, siempre cambiante y cargado de información es fundamental para el desarrollo de nuestras actividades y para la sobrevivencia de millones de organismos. Señales en el ambiente de diversa naturaleza, como vibraciones, fotones y señales químicas, interactúan con los diferentes órganos sensoriales, permitiéndonos recibir información del entorno y llevarla en forma de señales eléctricas y/o bioquímicas a uno de los órganos más complejos del cuerpo humano, el cerebro. Allí esta información es procesada, traducida e interpretada, desencadenando una diversidad de procesos de alta complejidad.

Los seres humanos poseemos sistemas sensoriales altamente sofisticados, sin embargo, algunos animales disponen de sistemas sensoriales que, a lo largo del tiempo, se han adaptado a sus necesidades y han logrado alcanzar altos niveles de sensibilidad y complejidad. Ejemplo de esto, es el elefante africano, que ha mostrado ser uno de los seres vivos con uno de los olfatos más sofisticados, con un repertorio genético exclusivo para dicho sistema sensorial 5 veces más extenso que el de un humano (Niimura et al., 2014). Interesantemente la organización estructural del sistema olfativo está altamente conservada a través de la evolución; su estructura y función es similar en una amplia gama de seres



vivos que incluyen a invertebrados y mamíferos. Esto sugiere que los mecanismos de procesamiento de información de olores fueron generados temprano en la evolución y mantenidos a lo largo de ella (Ache, et al., 2005; Brennan y Keverne, 1997; Vosshall y Stocker, 2007). Aunque los humanos somos menos dependientes del aporte químico sensorial olfativo que otros animales, este sistema tiene un rol crítico en nuestra salud y comportamiento; la generación de sensaciones de placer, el mantenimiento del estado de ánimo, influencia en la sexualidad y procesos más complejos como la generación de memorias, son algunos de los comportamientos asociados a la percepción olfatoria.

En este contexto, es que el sistema olfativo de algunos invertebrados como la mosca *Drosophila melanogaster*, se ha vuelto una importante plataforma experimental en los últimos años. Si bien, se ha avanzado enormemente en el conocimiento de la organización anatómica del sistema olfatorio de mamíferos e invertebrados, hay poca evidencia científica respecto a los procesos celulares encargados de que la información detectada a nivel del receptor, sea procesada en varias áreas del cerebro. Es por esto que esfuerzos en descubrir nuevas pistas que expliquen cuáles son los mecanismos celulares responsables de relacionarnos con nuestro entorno y orquestar nuestras conductas en respuesta a señales olfativas, son esenciales para entender como nos adaptamos al mundo en que vivimos, desde hace miles de años y hasta el día de hoy.

## **1.2 *Drosophila melanogaster* como modelo experimental.**

Para avanzar en esta búsqueda y aprovechando la convergencia evolutiva del sistema olfativo, se ha pensado en un modelo de estudio de fácil acceso y baja complejidad como la mosca *Drosophila melanogaster* (*Dm*).

Entre 1901-1910, William Castle y Thomas Morgan hicieron los primeros acercamientos en investigación con *Dm* como modelo experimental. Sin embargo, fue T. Morgan quién, retomando parte del trabajo de Castle, realizó grandes contribuciones en genética. Este trabajo le hicieron merecedor del premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1933 por sus descubrimientos sobre el papel que juegan los cromosomas en la herencia. Parte de las ventajas que vieron Morgan y Castle en este modelo sobre otros modelos, fue principalmente que son fáciles de manipular y de bajo costo de mantención en condiciones de laboratorio. Además, existen pocas restricciones para trabajar con este modelo en el laboratorio, a diferencia de vertebrados. Por otra parte, al comparar los genomas secuenciados de *Dm* y humanos, se ha logrado observar que cerca de un 75% de los genes asociados enfermedades en humanos, tienen un homólogo en *Dm*. Todo esto ha permitido que este modelo abarque un amplio espectro de áreas de investigación, pasando por genética y herencia, desarrollo embrionario, cáncer, patologías neurodegenerativas, adicción, ciclo circadiano, sistemas sensoriales, envejecimiento, etc. (Rubin, 1988; Mollereau y Ma, 2014; Rudrapatna et al., 2012; Brandt y Vilcinskas, 2013; Venken et al., 2016). En esta

misma línea, otra de las ventajas más relevantes y que explican que el trabajo en este modelo se haya expandido en el mundo, se fundamenta en las múltiples variantes de manipulación y acceso a la genética de *Dm*. Así, una de las herramientas más utilizadas en este modelo es el sistema UAS/GAL4 (Hitoshi Kakidani y Mark Ptashne, 1988) el que se explicará en breve.

Todo esto en conjunto, ha sido de gran utilidad para avanzar en la descripción de los procesos desencadenados en la codificación e interpretación de olores. Las ventajas presentes en este modelo y la alta similitud estructural e incluso funcional del sistema olfativo respecto al de vertebrados, fue utilizado en este trabajo para avanzar en la comprensión de los procesos orquestados por este sistema sensorial.

### **1.2.1 Sistema UAS/GAL4.**

El sistema UAS/GAL4 es una herramienta genética, que se utiliza principalmente para el estudio de la expresión y funcionalidad de distintos genes de interés. Se compone de dos partes: 1) el gen *gal4* que codifica para una proteína activadora de la transcripción de genes en levadura, y 2) un enhancer (secuencia de activación de la transcripción de genes denominada UAS por sus siglas en inglés) que al interactuar con la proteína GAL4, es capaz de activar la transcripción del gen río abajo a dicha secuencia. En *Dm* se han generado mediante inserción aleatoria mediada por transposones endógenos de *Dm* (como los elementos P), múltiples cepas capaces de expresar GAL4 de manera tejido específico. Es decir,

se ha logrado insertar el gen de la proteína GAL4 en secciones del genoma controladas por promotores tejido específicos. Estas cepas se pueden encontrar en una base de datos universal conocida como FlyBase, donde es posible encontrar información de distintas herramientas genéticas disponibles en *Dm*. Allí se almacena información de todos los tipos de cepas GAL4 que se han generado y que se generan constantemente, la mayoría de estas cepas están disponibles en distintos centros de almacenaje o centros de stocks; el más conocido es Bloomington Stock Center, administrado por la Universidad de Indiana, en Indiana, EEUU. Del mismo modo es posible encontrar “cepas reporteras” que en todas sus células poseen una secuencia UAS controlando la expresión de un gen en particular. Así, mediante cruces de moscas que expresen GAL4 de manera tejido específica con moscas que posean la secuencia UAS asociada a un gen de interés, será posible expresar en la descendencia y de manera tejido específica el gen que queramos estudiar (figura 1). El sistema UAS/GAL4 permite también expresar herramientas genéticas como los RNAi, que permiten interferir la traducción de genes mediante la unión a RNA mensajeros.

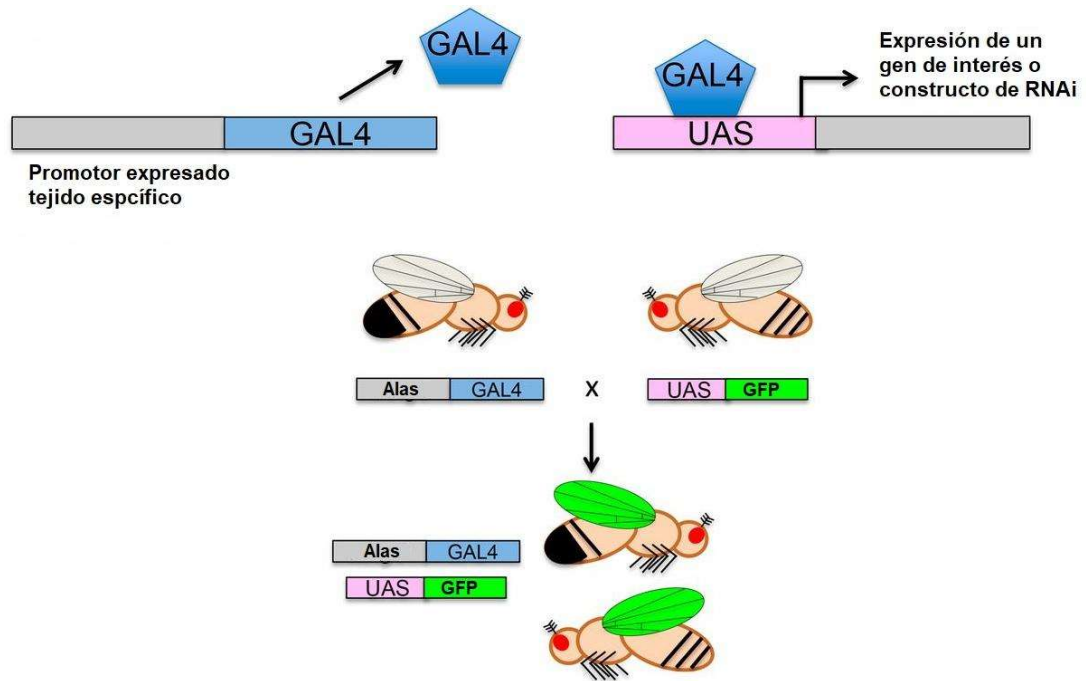


Figura 1. Sistema GAL4/UAS para expresión modular de transgenes en tejidos específicos. Para expresar un transgén o un constructo RNAi en un tejido particular, se necesitan moscas que contengan en su DNA la secuencia que codifica para el factor de transcripción GAL4 de levadura bajo control de un promotor o enhancer expresado de manera tejido específico (izquierda), y por otro lado, el gen de interés a ser expresado a continuación de la secuencia activadora río arriba (UAS), que es la que es reconocida y activada por GAL4 (derecha). Las moscas transgénicas que portan cualquiera de los dos constructos solos no expresan el gen de interés, y por tanto son fenotípicamente iguales a moscas silvestres ("wildtype"). Sin embargo, cuando estas moscas se cruzan, el enhancer tejido específico (uno de ala en este ejemplo) dirige la expresión de GAL4, que estimula la expresión del gen de interés (GFP en este ejemplo) en el tejido especificado. Modificado de Hales et al., 2015.

### **1.3 Descripción del sistema olfativo de *Drosophila melanogaster*.**

#### **1.3.1 Homología con vertebrados.**

En *Dm*, una de las principales puertas de acceso a las señales del medioambiente, es el sistema olfativo, el cual está involucrado en la gestación de conductas, como aprendizaje y memoria (Fiala, 2007; Busto et al., 2010; Guven-Ozkan y Davis, 2014), cortejo y apareamiento (Li, et al., 2011; Yamamoto et al., 2014), ovoposición (Laturney y Billeter 2014; Haverkamp et al., 2018), comportamiento social (Simon et al., 2013), entre otras respuestas, vitales para la sobrevivencia.

Es importante mencionar que cada una de las estructuras asociadas al procesamiento de olores en vertebrados poseen su respectivo homólogo en insectos. De esta manera, la información olfativa en *Dm* y vertebrados es recibida por receptores de odorantes (ROs) ubicados en el epitelio nasal de mamíferos y vertebrados o en la antena en el caso de insectos. La unión de odorantes a estos receptores da como resultado la despolarización de neuronas receptoras de odorantes (NROs) y una señal neuronal que es transportada a través de proyecciones axonales hacia la primera región de procesamiento de información de olores, siendo en insectos el Lóbulo Antenal (LA), homólogo del Bulbo Olfatorio de mamíferos (BO). En *Dm* se pueden encontrar alrededor de 60 ROs y 1300 NROs. Cada NRO expresa un único RO (Vosshall et al., 1999; Vosshall, 2000; Goldman et al., 2005; Joseph and Carlson, 2015), y todas las NROs que

expresan el mismo RO proyectan a la misma subregión del lóbulo antenal, conocida como glomérulo (Lizbinski y Dacks, 2018). En esta zona del cerebro de *Dm*, los terminales axonales de cada NROs hacen sinapsis con dendritas de neuronas de proyección (NPs), que proyectan sus axones hacia regiones superiores del cerebro de la mosca, como lo son el cáliz de los Cuerpos fungiformes (CFs), involucrado en procesos de memoria y aprendizaje (Zars, 2000; Oswald y Waddell, 2015) y el asta lateral, involucrado en conductas innatas (Gupta y Stopfer, 2011; Sachse y Beshel, 2016; Schultzhaus et al., 2017). Finalmente, diversas poblaciones de neuronas locales de lóbulo antenal (NLs), modulan las sinapsis entre NROs y NPs, a nivel pre y post sináptico. De la misma manera, en vertebrados, las señales de odorantes recibidas por NROs, ubicadas en el epitelio olfatorio, son transportadas por NPs, hacia los glomérulos del bulbo olfatorio. En esta región, las NROs, al igual que en invertebrados, hacen sinapsis con neuronas que proyectan sus axones hacia regiones superiores del procesamiento de la información (neuronas mitrales/tufted (MT), homólogas de las NPs), como el tubérculo olfatorio, corteza piriforme, y otras regiones de la corteza olfatoria. Las neuronas locales de vertebrados, como las neuronas yuxtglomerulares y las periglomerulares, son las encargadas de modular las sinapsis entre NROs y MT de manera similar a como lo hacen neuronas locales de invertebrados (Figura 2).

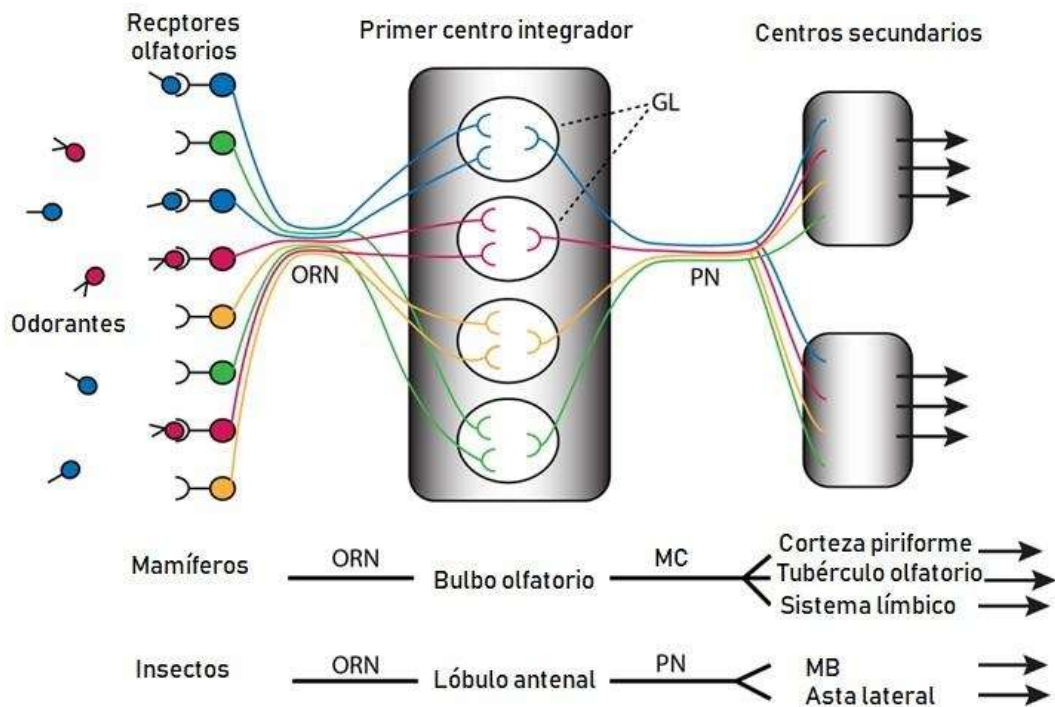


Figura 2. Comparación de la organización del sistema sensorial olfatorio de mamíferos e invertebrados. Figura comparativa del paso de la información olfativa a través de las distintas estructuras que conforman el sistema olfativo de mamíferos e insectos. Neuronas receptoras olfatorias (ORN por sus siglas en inglés), glomérulos (GL), Neuronas de proyección (PN por sus siglas en inglés), cuerpos fungiformes (MB por sus siglas en inglés), células mitrales (MC por sus siglas en inglés) que se componen por neuronas yuxtaglomerulares y las periglomerulares. Modificado de Vosshall y Stocker, 2007.



De manera más específica, en *Dm* se han descrito distintas modulaciones en las sinapsis de NROs y NPs. A nivel presináptico NROs son moduladas por las NLs, a través de inhibición por retroalimentación, proceso conocido como “Gain control” (Olsen y Wilson, 2008; Root et al., 2008). Mientras que a nivel postsináptico se han descrito dos modulaciones entre NLs y PNs: modulación por inhibición (inhibición lateral) o por excitación (excitación lateral) (Okada et al., 2009; Chou et al., 2010; Goillard et al., 2009; Olsen y Wilson, 2008; Padmanabhan y Urban, 2010; Rollmann, et al., 2010; Semmelhack y Wang, 2009). En este sentido se ha avanzado bastante en conocer estos mecanismos en el sistema olfativo de *Dm* y en proyectar este conocimiento a otros sistemas más complejos. Así hemos aprendido que tanto en los glomérulos de LA cómo en el de BO, en invertebrados y vertebrados respectivamente, la capacidad de decodificar la información de odorantes depende en gran parte de la compartimentalización y organización de las sinapsis de los distintos grupos neuronales (Galizia et al., 1999; Bushdid et al., 2014.). Por otra parte, si bien se conoce a cabalidad la distribución anatómica y morfológica del sistema olfativo de invertebrados y vertebrados y la naturaleza de sus componentes, existe poca información respecto a los procesos celulares que se desencadenan en estas neuronas y que orquestan los diversos procesos asociados a la integración y procesamiento de la información olfativa.

### **1.3.2. Integración de la información sensorial olfativa en *Dm*.**

Una de las hipótesis propuestas respecto a la integración sensorial olfatoria, y que se origina a partir del conocimiento obtenido en modelos invertebrados, radica en la capacidad de ciertos grupos neuronales de LA (principalmente NLs) de agruparse dinámicamente (no necesariamente producto de una cercanía espacial), sincronizando sus descargas (Getz and Akers, 1994; Laurent and Naraghi, 1994; Laurent, 1996; MacLeod and Laurent, 1996). Para lograr esto, es importante considerar la función que cumplen las NLs, donde su actividad inhibitoria o excitatoria es fundamental para poder comprender como, la sincronía neuronal en LA, está orquestando la distribución y procesamiento de la información proveniente de las señales de NROs y enviadas por PNs hacia regiones superiores. Esta sincronía permitiría a un estímulo que activa dos o más poblaciones de NROs, acoplarse o fusionarse dentro de las distintas agrupaciones de elementos sensoriales, al representar más de un objeto simultáneamente; otorgándole al sistema olfativo la capacidad de diferenciar estímulos simultáneos, que pueden variar incluso en pequeñas concentraciones presentes en el ambiente (Engel et al., 1990; Singer and Gray, 1995). De acorde a esto, estudios realizados en abejas demostraron que la actividad sincrónica del potencial de campo local (actividad electrofisiológica de un conjunto de células) es necesaria para realizar correctamente una tarea de discriminación fina de odorantes (Stopfer et al., 1997). En general, en *Dm* la información olfatoria es llevada desde receptores neuronales olfativos hacia LA por vías colinérgicas, lo

que también ocurre con la vía entre LA y cuerpos fungiformes (CFs), a través de fibras de NPs (Bicker, G. 1999; Yasuyama, K. 2002). Esto es diferente a lo que se observa en NLs, la cual presenta una identidad principalmente inhibitoria y mediada por GABA (Olsen y Wilson, 2008; Liang et al., 2014; Tsai et al., 2018). Adicionalmente se ha descrito una subpoblación de NLs excitatorias. Interesantemente, se visto cómo la variabilidad de circuitos de neuronas locales interactúan con la diversidad inhibitoria-excitatoria, permitiendo mejorar la capacidad codificante de las redes neuronales (Tsai et al., 2018). Se ha reportado que la relación de neuronas inhibitorias y excitatorias de NLs es de alrededor de 5:1 (Tsai et al., 2018). Sin embargo, cuando se silencian las respuestas evocadas por dos poblaciones GABAérgicas de NLs (NL1 y NL2), que cubren a aproximadamente un tercio de las NLs y donde sus sitios presinápticos se distribuyen a lo largo de todo el lóbulo antenal (inervan la gran mayoría de los glomérulos), no se observan cambios en los patrones de actividad evocados por olores, y por lo tanto en la capacidad de codificar olores (Strube-Bloss et al., 2017). Paralelamente poco se sabe respecto a la función de la actividad excitatoria de NLs, por lo que resulta interesante poder conocer la participación de las vías colinérgicas en esta región del cerebro de mosca.

### **1.3.3 Neuroquímica del sistema olfatorio de *Dm*.**

#### **1.3.3.1 Acetilcolina y receptores colinérgicos.**

Está demostrado que el neurotransmisor excitatorio principal en el sistema nervioso central de *Dm* es acetilcolina (Breer y Sattelle, 1987; Gundelfinger, 1992). Las vías colinérgicas del cerebro de mosca activan receptores nicotínicos de acetilcolina sensibles a  $\alpha$ -BTX (nAChRs) que median las sinapsis excitatorias detectadas en cerebro de mosca, tanto *in vivo* como *in vitro* (Su y O'Dowd, 2003; Gu y O'Dowd, 2006). Por otro lado, se ha descrito la existencia de receptores muscarínicos de acetilcolina en *Dm*, donde el receptor metabotrópico del tipo mAChR-A muestra amplia homología en su secuencia con los receptores mAChRs tipo M-1 de vertebrados (Shapiro et al., 1989; Blake et al., 1993; Millar et al., 1995). En esta misma línea, la expresión heteróloga de mAChR-A en células ováricas de hámster chino (CHO), evidencian que este receptor es activado por acetilcolina y muscarina, y bloqueado por antagonistas muscarínicos (atropina, escopolamina y bencilato de 3 quinuclidinilo (QNB) (Collin et al. 2013; Ren, G. et al., 2015). Interesantemente, se ha logrado evidenciar que mAChRs se encuentran ampliamente expresados en LA y cuerpos fungiformes (Blake et al., 1993; Hannan y Hall. 1996) y en el laboratorio del Dr. Campusano, se ha demostrado recientemente que mAChR-A contribuye al aprendizaje aversivo olfatorio en larvas de *Dm* (Silva et al., 2015). Otros receptores de tipo mAChRs se han descrito en *Dm* (mAChR-B y mAChR-C) (Ren, G. et al., 2015; Xia et al.,

2016). Sin embargo, poco se sabe respecto a la función de estos receptores en el sistema de *Dm*. Por otro lado, los estudios en sistemas heterólogos permite sugerir que al menos el receptor mAChR-C presenta una farmacología que lo diferencia del mAChR-A y de receptores muscarínicos en vertebrados (por ejemplo, no es activado por muscarina), lo que hace dudar que este sea en realidad un receptor muscarínico (Xia et al., 2016).

Si bien, se ha demostrado la participación de mAChR-A en conductas complejas como aprendizaje y memoria, existe poca información respecto a la señalización intracelular que la activación de estos receptores podría estar desencadenando en distintos grupos neuronales. Conocer cómo son las respuestas celulares gatilladas por estos receptores, en una de las primeras regiones de procesamiento de la información olfativa (lóbulo antenal), es uno de los objetivos de este trabajo, pretendiendo analizar distintamente la actividad de mAChR-A en NLs y NPs.

#### **1.3.3.2 Aminas Biogénicas.**

Las aminas biogénicas (ABs) son un grupo de moléculas neuroactivas sintetizadas a partir de aminoácidos, que actúan como neurotransmisores, neuromoduladores o neurohormonas en invertebrados y mamíferos. Incluyen a Serotonina (5-HT), Dopamina (DA), Octopamina (OA) (homólogo funcional de la noradrenalina en mamíferos), Tiramina, histamina, entre otras. Estas generan

efectos celulares mediados por la activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G.

Las ABs tiene funciones similares en vertebrados como en invertebrados. Por ejemplo, noradrenalina y su homólogo OA, afecta una gran gama de comportamientos, que incluyen la modulación de la atención, la excitación, la motivación, así como el aprendizaje y la memoria. Por su lado, DA tiene muchas funciones en el cerebro, incluyendo roles en el comportamiento y la cognición, la actividad motora, la motivación, el sueño, la atención y el aprendizaje, entre otras.

Distintas vías neuronales asociadas el procesamiento de la información olfativa en *Dm*, están bajo regulación de neurotransmisores de tipo ABs, y participan en los procesos de generación de memoria olfativa en *Dm* (Ren, G. et al., 2015). En *Dm*, se creía inicialmente que DA y OA participaban de manera selectiva en el aprendizaje aversivo y apetitivo respectivamente (Schwaerzel et al., 2003). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que dopamina también participa en aprendizaje apetitivo (Kim et al., 2007; Burke et al., 2012; Liu et al., 2012; Qin et al., 2012). Esto generó controversia en algunos investigadores, pero parece ser el consenso actual que DA es uno de los principales protagonistas en los procesos de aprendizaje y memoria (Cognigni et al., 2018; Waddell, S. 2013). Interesantemente, en estudios recientes se ha demostrado que moscas que poseen la actividad octopaminérgica disminuida, presentan un deterioro en el aprendizaje aversivo (Iliadi et al, 2017). Y no sólo eso, diversos trabajos reafirman

la hipótesis de que octopamina también es crucial para gobernar procesos de memoria asociativa olfatoria, ya que se ha comprobado que puede afectar circuitos dopaminérgicos claves en la consolidación de estos procesos (Burke et al., 2012; Chen et al., 2013; Wu et al., 2013; Guven-Ozkan y Davis, 2014).

El poder conocer cómo diferentes moduladores, tales como OA y DA, logran actuar en conjunto o con otros componentes de modulación neuronal, sintonizando el sistema nervioso de *Dm* hacia estados específicos que respondan a las señales del entorno, es una tarea aún en desarrollo. Para poder avanzar en esto, es crucial conocer las funciones de ABs en regiones tempranas del procesamiento de la información, como el LA.

Los tres tipos principales de neuronas en LA (NROs, NLs y NPs), están sujetos a fuentes intrínsecas y extrínsecas de neuromodulación. En insectos NLs no sólo liberan GABA, sino también DA y un conjunto de neuropéptidos. Por otro lado, LA está inervado por neuronas centrífugas las cuales liberan serotonina (5-HT), DA y octopamina (OA) actuando como moduladores extrínsecos, en vertebrados se denomina neuronas centrífugas en el sistema olfativo a aquellas que inervan BO proviniendo de la corteza olfatoria u otras regiones, una nomenclatura que es usada por algunos autores para esta inervación en LA (figura 3a) (ver revisión bibliográfica: Lizbinski y Dacks, 2017). Esta modulación extrínseca e intrínseca también ocurre en vertebrados (figura 3b), donde NE y 5-HT se proponen como moduladores exclusivamente extrínsecos (al igual que en insectos), a diferencia

de DA que parece actuar como un posible modulador intrínseco (distinto a insectos, donde se propone como modulador intrínseco y extrínseco) (Lizbinski y Dacks, 2017). Si bien, se conoce la presencia y distribución de componentes de ABs en LA, poca información existe respecto a las funciones celulares de estos neuromoduladores en esta región del cerebro de *Dm*. En este trabajo, se avanzó principalmente en la descripción de la actividad octopaminérgica de LA.

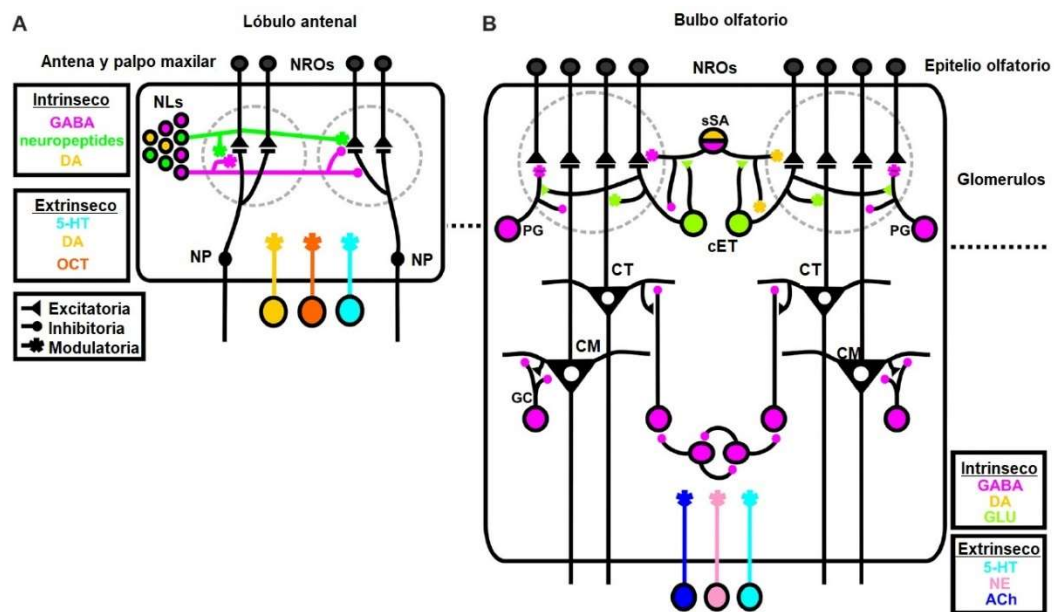


Figura 3. Fuentes intrínsecas y extrínsecas de neuromodulación en el sistema olfatorio de insectos y vertebrados. A) En el lóbulo antenal de insectos (LA), los tres principales tipos de neuronas, neuronas receptoras de odorantes (NROs), neuronas locales (NL) y neuronas de proyección (NP), convergen en los glomérulos y están sujetas a fuentes intrínsecas y extrínsecas de modulación. GABA (magenta), dopamina (DA; amarillo) y un conjunto de neuropéptidos (verde) liberados por NLs actúan como moduladores intrínsecos, mientras que serotonina (5-HT; azul), DA y octopamina (OCT; naranja) actúan como moduladores extrínsecos para alterar contextualmente el procesamiento olfativo. B) En el bulbo olfatorio de vertebrados los subtipos de NLs, actúan ampliamente como moduladores intrínsecos. Células periglomerulares GABAérgicas (PG), células de tufted externas o yuxtaglomerulares glutaminérgicas (cET; verde claro) y GABAérgicas/Dopaminérgicas (sSA; magenta/amarillo) hacen sinapsis sobre NROs y células mitrales/tufted (CM/CT). Células granulares GABAérgicas (GC), hacen sinapsis con CM/CT para alterar la salida de la información desde BO. Tanto el AL como el OB están inervados por fuentes extrínsecas de 5-HT, norepinephrine (NE; rosa) u Octopamina y acetilcolina (ACh; púrpura). modificado de Lizbinski, K. M. et al., 2018.



### 1.3.3.3 Señalización de receptores de aminas biogénicas.

En el laboratorio del Dr. Campusano se han estudiado las propiedades de las respuestas celulares de ABs en células de cuerpos fungiformes. En este sentido,  $Ca^{2+}$  aparece como un componente importante en la señalización de receptores de ABs y se ha reportado que receptores de DA y OA son capaces de producir aumento en los niveles de calcio intracelular (Leyton et al., 2014). Por otra parte, hemos postulado que la activación de receptores para ABs y nAChRs producen respuestas celulares capaces de interactuar entre sí, durante el aprendizaje asociativo de olores (Leyton et al., 2014). Lamentablemente, la posibilidad de interacción funcional en las respuestas celulares inducidas por ABs y receptores colinérgicos, que pudieran contribuir a nivel del LA al procesamiento inicial de la información sensorial olfativa, no ha sido estudiado aún.

Como se vio anteriormente, OA y 5-HT cumplen funciones similares en LA y BO, ya que ambas ABs se han propuesto como neuromoduladores extrínsecos. Por otra parte, DA es una amina biogénica con una importante y amplia participación en CFs de *Dm*, una región de cerebro de mosca reconocida por participar en conductas asociadas a olores. Sin embargo, un estudio en abejas ha propuesto a OA como el principal neuromodulador de LA (Rein et al., 2013). La alta semejanza que presenta *Dm* con este modelo y la poca información respecto a la expresión de receptores dopaminérgicos en LA, nos hace pensar que OA podría ser también el principal neuromodulador en esta región del cerebro de *Dm*.

Cuatro distintos receptores de octopamina han sido identificados en *Dm* (Han et al., 1998; Maqueira et al., 2005), por un lado, están los receptores octopaminérgicos OctB1R, OctB2R y OctB3R, que al evaluar sus respuestas celulares en sistemas heterólogos, se les atribuyó una función similar a los receptores beta adrenérgicos de humanos y por consiguiente a cambios en los niveles de AMPc (Maqueira et al., 2005). Por otra parte, hay un cuarto receptor de octopamina, receptor de octopamina alfa 1 (OAMB), asociado a cambios en niveles intracelulares de calcio y AMPc. La expresión de Octa1R/OAMB es considerablemente baja, al igual que la de OctB1R y OctB2R (El-Kholy et al., 2015).

En esta misma línea, algo que llama la atención es un trabajo que evaluaba la expresión de los receptores octopaminérgicos de *Dm*. En este trabajo se describió un receptor para octopamina (receptor de octopamina tipo beta 3, OctB3R) que se expresa fuertemente en LA (figura 4a y b). De hecho, su expresión relativa sugiere que OctB3R es casi exclusiva para regiones del sistema olfativo, dado que se encuentra en muy bajos niveles en otras áreas cerebrales de mosca. Además, los otros receptores tipo beta de OA no parecen expresarse a niveles comparables en LA (Tabla 1).

Por otro lado, en un reciente estudio donde se identifican distintos genes que promueven o inhiben la formación de memoria olfatoria en *Dm*, OctB3R aparece como un posible gen que estaría participando en el procesamiento de memoria

olfatoria (Walkinshaw, et al. 2015). No se conocen los mecanismos celulares gatillados por OctB3R a nivel de LA, así como tampoco los efectos en la conducta al activar o inhibir estos receptores en neuronas de mosca particularmente en las neuronas de LA, lo que en parte fue un objetivo de estudio en esta tesis.

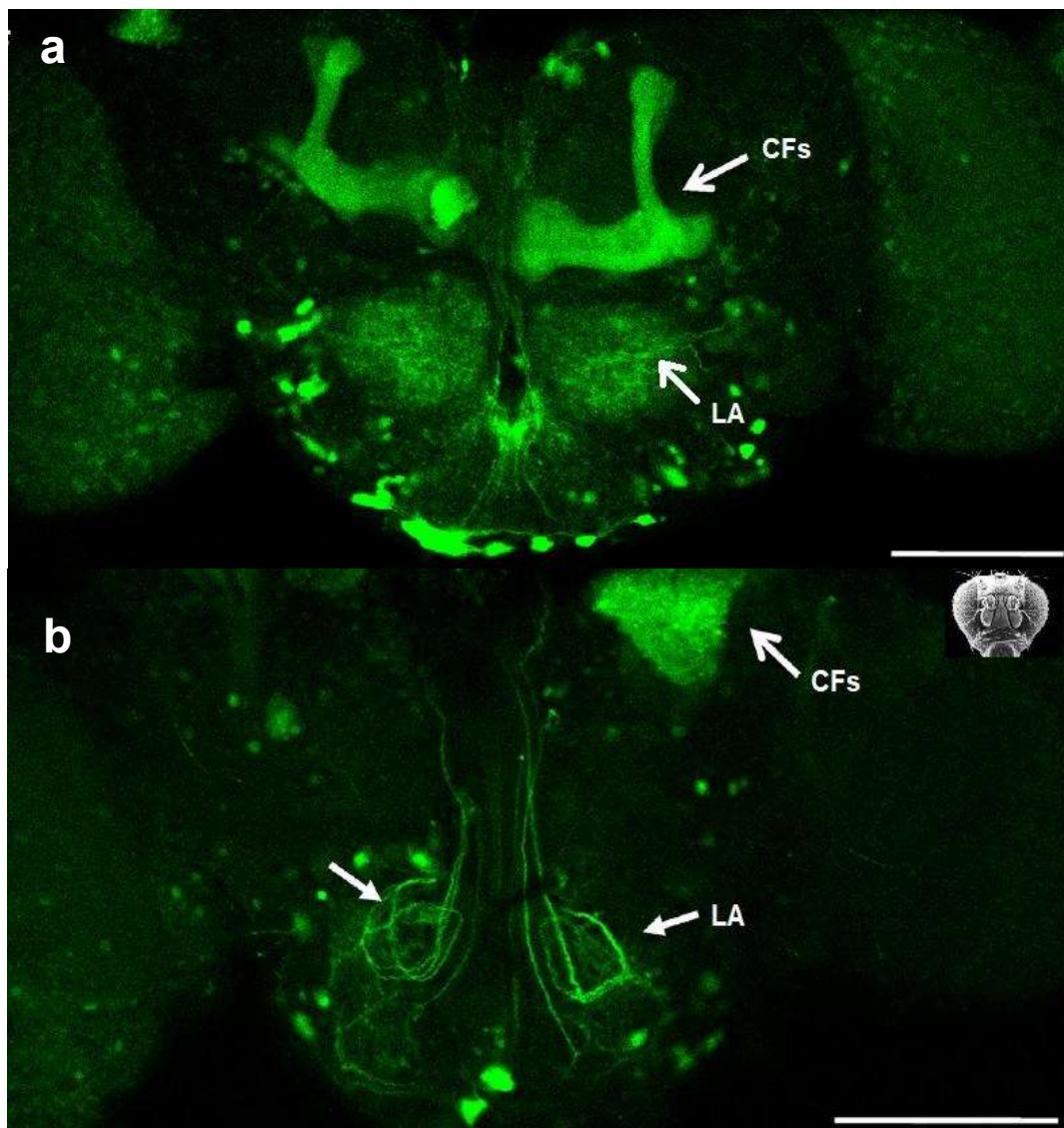


Figura 4. Microfotografía fluorescente que muestra la actividad del enhancer de OctB3R. Dos planos ópticos diferentes (a y b) muestran que la expresión se evidencia en diferentes partes del cerebro. Mientras que los cuerpos fungiformes (CFs) muestran una tinción prominente (flechas en a, b), diferentes estructuras asociadas a los lóbulos antenales también muestran una expresión similar (b). Escala de las barras 100  $\mu$ m. Modificado de El-Kholy, et al., 2015.

Receptor	Brain	MB	PI	AL	OL	Trachea	Intestine	Muscle	Oenocyte	Fat body	SG	MT	Heart	RO
Oamb	++	+++	++	+	++	++	+	++	-	-	-	-	-	+++
Octβ1R	+++	++	++	+	+	++	+	+	-	-	-	-	-	+
Octβ2R	++	+++	++	+	+	++	+	+++	-	++	+	+	-	+++
Octβ3R	++	++	+	+++	+	+	-	+	-	-	-	++	-	+

Tabla 1. Análisis de la expresión relativa de receptores de octopamina. - No hay expresión detectable, + expresión menor, ++ expresión fuerte, +++ expresión muy fuerte. Regiones estudiadas: cuerpos fungiformes, CFs; Pairs intercerebralis, PI; lóbulo antenal, LA; lóbulos ópticos, LO; glándulas salivales, GS; túbulos Malpighi, TM; órganos reproductores, OR. Se puede observar una expresión casi exclusiva de Octβ3R en LA, siendo además LA región donde más se expresa Octβ3R. Modificado de El-Kholy, et al. 2015.

En resumen, existe valiosa información respecto a la distribución y naturaleza de diversos componentes que conforman una de las primeras regiones del cerebro de mamíferos e invertebrados en procesar la información proveniente del entorno (LA y BO). En este modelo, ACh está ampliamente distribuido y es el neurotransmisor excitatorio principal en el sistema nervioso central de *Dm*, que actúa mediante la interacción con nAChRs y mAChRs, que se expresan en LA. De manera particular, nueva información sugiere que mAChRs estarían participando en procesos complejos del procesamiento de la información olfatoria, como la formación de memoria y aprendizaje olfativo. Por otro lado, diversos neuromoduladores del tipo ABs cumplen un rol fundamental en la codificación llevada a cabo en esta región y otras regiones del cerebro de *Dm*. Así, algunas de las varias preguntas abiertas en este campo son: ¿Cuál es el rol de ABs y específicamente OA, a nivel de LA, en el procesamiento de información olfativa? ¿Es posible que sistemas de aminas biogénicas interactúen con componentes colinérgicos en regiones tempranas del procesamiento de memoria, como LA? ¿Receptores muscarínicos podrían estar regulando el

procesamiento de memoria olfatoria a nivel de LA? ¿Cómo distintas poblaciones de LA están interactuando con componentes de ABs y colinérgicos, que contribuyan al procesamiento de la información olfativa? ¿Existe alguna modulación diferencial, en las diferentes poblaciones neuronales de LA, que dependa de factores extrínsecos de neuromodulación, como las ABs o ACh? El estudio de las respuestas inducidas por receptores muscarínicos y de octopamina tipo OctB3 en diferentes poblaciones neuronales de LA, lo que pudiera modular el procesamiento de conductas olfatorias, fue uno de los objetos de este trabajo.

Para esto se propuso evaluar la siguiente hipótesis:

## **2. HIPÓTESIS DEL TRABAJO.**

Las dinámicas de calcio intracelular asociadas a la activación de receptores muscarínicos de acetilcolina de tipo A (mAChR-A) y octopaminérgicos beta 3 (OctB3R) en lóbulo antenal, contribuyen al procesamiento de olores en *Drosophila*.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL.**

Como objetivo general se propuso evaluar cambios en los niveles de calcio intracelular, posterior a la activación de receptores muscarínicos y octopaminérgicos en diferentes poblaciones neuronales de lóbulo antenal y

evaluar la contribución de estos receptores al procesamiento de olores en *Drosophila*.

### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

#### **3.1.1. Analizar las dinámicas de calcio intracelular asociadas a la activación de receptores muscarínicos en LA:**

**3.1.2.** Analizar las respuestas de calcio intracelular frente a acetilcolina y en presencia de un antagonista nicotínico, en neuronas locales y de proyección de lóbulo antenal.

#### **3.1.3. Analizar las dinámicas de calcio intracelular asociadas a la activación de receptores octopaminérgicos en LA:**

- Analizar respuestas de calcio intracelular frente a octopamina en neuronas locales y de proyección de lóbulo antenal.

#### **3.1.4. Analizar la participación de receptores OctB3 y mACh-A de Lóbulo antenal, en el procesamiento de información olfativa.**

Mediante experimentos conductuales:

- Estudiar el procesamiento de información olfativa en moscas mutantes para OctB3R.
- Estudiar el procesamiento de información olfativa en moscas que expresen RNAi para OctB3R en distintas poblaciones neuronales de lóbulo antenal.

- Estudiar el procesamiento de información olfativa en moscas que expresen RNAi para mAChR-A en distintas poblaciones neuronales de lóbulo antenal.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1 Cuidado y mantención de las moscas.**

Todas las moscas se mantuvieron en una sala acondicionada a 19 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 hrs. Las moscas fueron alimentadas en viales (Genesee Scientific Co. Flystugg, USA) con un medio estándar de comida para *Dm*. La comida utilizada contiene harina, levadura, sacarosa (Sigma-Aldric), agar (Sigma-Aldrich), ácido propiónico -bactericida- (Sigma-Aldrich) y nipagin -fungicida- (Sigma-Aldrich). Para los experimentos conductuales, una vez eclosionadas las moscas, fueron colocadas en botellas para poder tener mayor número de moscas, y se mantuvieron a 26°C para aumentar la eficiencia del sistema UAS/GAL4. Para la preparación de cultivos primarios todo el desarrollo de las larvas hasta el 2º estadio de pupa, identificado como se presenta en Figura 5, fue a 26°C.

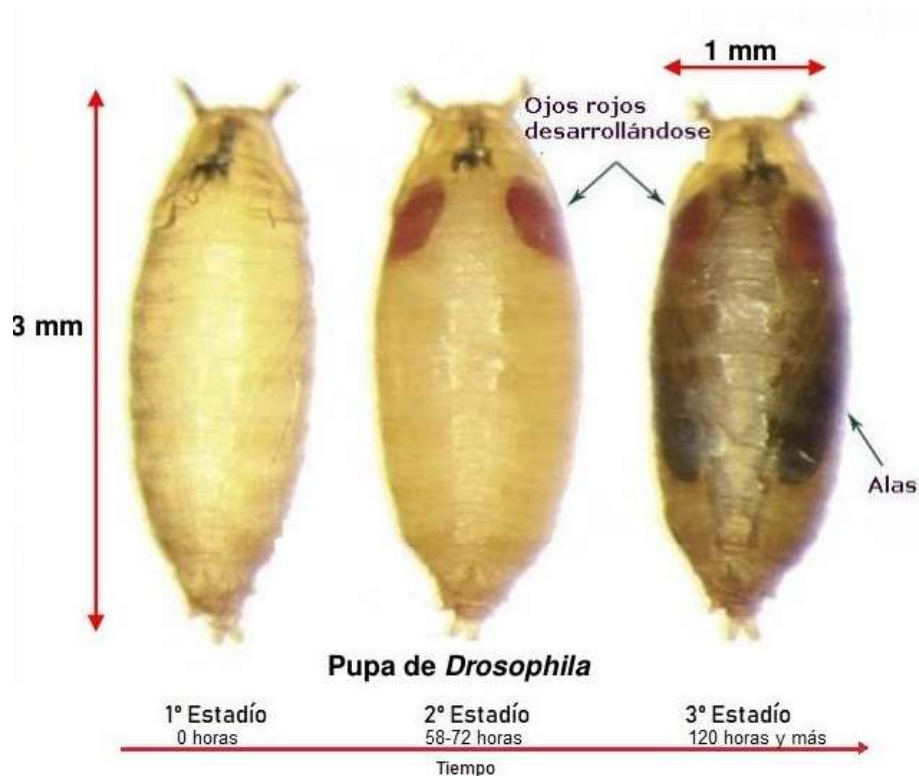


Figura 5. Pupas de *Drosophila melanogaster* divididas en 3 estadios, ordenados cronológicamente. Se utilizaron cabezas de pupas en 2º estadio para la producción de cultivos primarios de cerebro de mosca.

#### 4.2 Cepas de *Drosophila* y cruzas.

Todas de las cepas mutantes y transgénicas utilizadas en este trabajo derivan de centros de stock de moscas (Bloomington *Drosophila* Stock Center, BDSC, y el Viena *Drosophila* Resource Center, (VDRC)) y también del stock del laboratorio del Dr. Campusano. En la tabla 2 se señalan todas las cepas utilizadas.

Para la expresión de GFP en las distintas poblaciones neuronales de LA se realizaron las siguientes cruzas: gh146-Gal4 x UAS-GFP (para NPs de LA); y GMR14H04-Gal4 x UAS-GFP (para NLS de LA).



Para la expresión de los RNAi de mAChR y Oct $\beta$ 3R en distintas poblaciones neuronales de LA, se realizaron las siguientes cruzas: gh146-Gal4 x UAS-RNAi Oct $\beta$ 3R; gh146-Gal4 x UAS-RNAi mAChR; GMR14H04-Gal4 x UAS-RNAi Oct $\beta$ 3R; GMR14H04-Gal4 x UAS-RNAi mAChR; ok66-Gal4 x UAS-RNAi Oct $\beta$ 3R; ok66-Gal4 x UAS-RNAi mAChR. Todas las cruzas fueron realizadas con hembras vírgenes transgénicas que contenían el UAS-gen y machos que contenían el elemento transgénico Gal4.

#### **4.3 Montaje y visualización de cerebros completos de *Dm*, bajo microscopio Confocal o Spinning disc.**

Para observar cerebros completos de mosca bajo microscopio spinning disc o confocal, se realizó el siguiente procedimiento:

Se obtuvieron cerebros de moscas adultas y/o pupas en tercer estadio. Posterior a la extracción se realizaron 3 lavados con tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés).

<b>Cepa</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Comentarios</b>	<b>Referencia</b>
UAS-RNAi Octβ3R	3	RNAi para el transcrito de Octβ3R de <i>Dm</i>	BDSC
UAS-RNAi -mAChR-A	3	RNAi para el transcrito de mAChR-a de <i>Dm</i>	BDSC
UAS-GFP	3	Permite expresión de una proteína fluorescente verde (GFP)	Pirrotta, V. (1988)
GH146 GAL4	2	Promotor regulador de expresión en neuronas de proyección de LA	Stocker, R.F. (1997)
OK66 GAL4	3	Promotor regulador de expresión intensa en NL de LA y leve expresión en CFs	CSHL
GMR14H04 GAL4	1 y 3	Promotor regulador de expresión intensa en neuronas locales de LA	BDSC
GH146; GFP	R	Expresión de GFP en neuronas de proyección de LA	Campusano Lab.
GH146QF; Tomato	R	Expresión de Tomato en neuronas de proyección de LA	BDSC
C309, GFP	R	Expresión GFP en neuronas de CFs	Campusano Lab.

Tabla 2. Cepas Gal4, UAS, mutantes y controles utilizados. Se señala el cromosoma donde se encuentra la inserción o mutación, el tipo de mutación cuando corresponda y referencia donde fue utilizada o adquirida. BDSC: Bloomington Drosophila Stock Center. CSHL: Zhong Lab, Cold Spring Harbor Laboratory. LA: Lóbulo antenal. CFs: Cuerpos fungiformes. R: Recombinante.

Luego se fijaron los cerebros durante 20 min. en solución al 4% de paraformaldheído (PFA). Se volvieron a lavar los cerebros dos veces en PBS y dos veces más en solución PBS + Tween 1% (PBT); cada lavado duró 5 min, en agitación. Los cerebros se montaron en portaobjetos de vidrio de 75 x 25 mm, cubiertos con cubreobjetos cuadrados de 25 mm y 0,16 mm de espesor. Se agregaron 20 uL de solución 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Scientific) 1 mg/mL previo a cubrir los cerebros con el cubre objeto. Se visualizaron los cerebros en un microscopio spinning disc IX81 invertido y/o un microscopio confocal espectral Nikon.

#### **4.4 Cultivos primarios de neuronas de mosca.**

El procedimiento ha sido descrito anteriormente (Sicaeros et al., 2007; Jorge M. Campusano et al., 2007; Leyton et al., 2014). Los cultivos se realizaron a partir de cerebros de pupas en segundo estadio (figura 5) de los siguientes animales: gh146-Gal4, UAS-GFP (que expresan GFP en NP de LA), GMR14H04-Gal4, UAS-GFP (que expresan GFP en NLs de LA), gh146-QF, QUAS-Tomato y gh146, GFP. Durante todo el procedimiento, los cerebros se mantuvieron en solución de disección (DS): NaCl 137 mM; KCl 5,4 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,17 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,22 mM; Hepes 9,9 mM; Glucosa 33,3 mM; Sacarosa 43,8 uM; pH ajustado a 7,4 con NaOH. Posterior a la disección, los cerebros fueron disgregados en una solución enzimática: Papaína 50 U; 0,8 mg L-cisteína (Sigma C7755), NaOH 0,15 mM. Durante 15 min a 80-100 rpm. Luego se realizaron 3 lavados con DS y posteriormente 3 lavados adicionales con medio de cultivo DMEM/F-12 (Irvine

Scientific) suplementado (DMEM SUP) con: 200 mM L-Glutamina, 20 mM HEPES, Transferrina 100 ug/mL. (Sigma T-1147), Putrescina 50 ug/mL. (Sigma P-5780), Insulina 50 ug/mL. (Sigma I-6634), Selenio 30 nM. (Sodium selenite S-5261), Progesterona 20 ng/mL. (Sigma P-6149), 20-Hydroxiecdisona 2.1 uM (Sigma H-5142). Cada cerebro fue mecánicamente dissociado y las células obtenidas de cada cerebro se sembraron en una gota de 5 uL, sobre placas de cultivo con fondo de vidrio de 35-mm (Corp, MatTek, Ashland, MA, EEUU) previamente cubiertas con concavalina A y laminina. Se dejaron reposar por 30 min. en una incubadora a 23°C con 5% de CO<sub>2</sub>, para permitir que las células se adhieran a la placa. Posterior a los 30 min. se agregan 80 uL y dejaron nuevamente en la incubadora por 30 min. A continuación, se agregaron 1420 uL y se dejaron en la incubadora por 24 hrs. Luego de esto, se agregaron 500 uL de medio condicionado neurobasal (cNBM) con glucosa (4.5 mg/mL). Luego de 3-4 días, se alimentan los cultivos por reemplazo de la mitad del medio de cultivo con una mezcla (3:1) de DMEM SUP y cNBM. Los cultivos se utilizaron en ventanas de 3-6 días.

#### **4.5 Imágenes de calcio.**

El procedimiento experimental ha sido descrito anteriormente (Su y O'Dowd, 2003; Jorge M. Campusano et al., 2007; Leyton et al., 2014). Los cultivos se lavaron 3 veces con solución HEPES buffer salt solution (HBSS): NaCl 12 mM, KCl 0,54 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,18 mM; MgCl<sub>2</sub> 0,08 mM; glucosa 1,5 mM; NaOH 1 mM; HEPES 2 mM, Rojo fenol 0,01%, pH=7,55. Posteriormente se reemplazó 1 mL del medio

de la placa donde se encuentran las células por 1 mL de solución que contiene colorante indicador de calcio Fura-2 acetoximetil ester (Fura-2 AM) (5  $\mu$ M, Molecular Probes, Eugene, OR) y ácido plurónico (0,1%, Molecular Probes, Eugene, OR) y se incubó durante 35 min. a temperatura ambiente, en oscuridad, para permitir el ingreso del fluoroforo al interior de las células. Se lavaron nuevamente 3 veces con HBSS y se incubaron durante 45 min. a temperatura ambiente y oscuridad para permitir la diestirificación completa del éster AM. Posteriormente se lavaron 3 veces con HBSS para eliminar el Fura-2 AM del medio extracelular (figura 6).

Fura-2 es un indicador radiométrico con dos longitudes de onda de excitación: 340 nm cuando Fura-2 está unido a calcio, y a 380 nm cuando no está unida a calcio. En ambas condiciones emite fluorescencia a 510 nm. Las células fueron analizadas en un microscopio spinning disc IX81 invertido, con un objetivo 10x UPLSAPO N.A 0.4 W.D 3.1 mM. La iluminación fluorescente fue provista por una Lámpara de mercurio de 200W Excelitas Modelo: X-cite. Se utilizaron filtros específicos para 340 nm y 380 nm. Todas las imágenes fueron adquiridas a la longitud de emisión 510 nm y cada imagen obtenida a intervalos de 2 a 3 seg. por una cámara digital CCD Orca-R2 Hamamatsu C10600, tamaño de pixel 6,45  $\mu$ m x 6,45  $\mu$ m. La razón 340/380 de las imágenes fueron generadas digitalmente por el software CellSens Dimension versión 1.14. Todos los experimentos fueron realizados en presencia de Tetradotoxina 1  $\mu$ M.



Fármacos	Función	Concentración en Cultivo
Tetradotoxina (a labs)	Bloqueador de receptores Na <sub>v</sub>	1 uM
Acetylcholine Chloride (Sigma–Aldrich)	Activador colinérgico	1 mM
a (Sigma–Aldrich)	Agonista muscarínico	1 mM
Octopamine a (Sigma-Aldrich)	Ligando receptor octopamina	10 uM
a hydrochloride (Curare) (Sigma–Aldrich)	Antagonistas Nicotínico	100 uM
Ionomycin	Formador de ionoporos de Calcio	1 uM

Tabla 3. Compuestos utilizados durante los experimentos de imágenes de calcio. Todas las concentraciones se refieren a concentración final en cultivo. Todos los fármacos fueron disueltos en HBSS.

Posterior a la adquisición de las imágenes se procedió a seleccionar los ROIs (regiones de interés), correspondiente a los somas de células fluorescente-positivas (expresión de GFP o de proteínas fluorescentes rojas, de acuerdo a cada experimento. Se extrajeron los valores de emisión para los rangos de excitación 340 y 380 (nm), y se analizaron en Excel los valores de la razón 340/380. Se incluyeron en análisis estadísticos todos los datos obtenidos, excepto aquellos que no cumplen con criterios previamente establecidos (Jorge M. Campusano et al., 2007; Leyton et al., 2014):

Basales altos: Aquellas células con valores basales de la razón 340/380 mayores a 2 fueron excluidas del análisis (mal manejo de niveles de calcio intracelular).

Transientes inespecíficos: Células con transientes de calcio intracelular próximos temporalmente a la aplicación de algún estímulo fueron excluidas del análisis para ese estímulo (podrían confundir respuestas).

Ionomicina: Células que posterior a la adición de ionomicina presentaran valores de la razón 340/380 que sean menores a 9 fueron excluidas del análisis (mal manejo de calcio intracelular).

Otros criterios: Señales inespecíficas, baja expresión de GFP, células GFP+ adyacentes a células GFP-.

La respuesta a un determinado fármaco se expresó como razón 340/380 sobre el nivel basal. Este valor se obtuvo restando el promedio de los valores basales de 340/380 medidos 10 a 20 seg. antes de la adición del fármaco, al valor máximo de la señal de calcio intracelular cuando las células se encontraban en presencia del fármaco. Por cada experimento se utilizó un cultivo. En cada campo visual es posible observar hasta 40 células GFP+ aproximadamente, de las cuales se seleccionaron entre 10-30 neuronas. Un campo visual en el microscopio contiene 60-90 células en total, aproximadamente. Se graficaron las respuestas de cada una de las células seleccionadas en cada los cultivo., Cada célula representa un n=1 y se consideraron para el análisis células provenientes de al menos 3 cultivos diferentes. Los datos fueron analizados en Graph Pad Prism 6.



#### **4.6 Medición AMPc intracelular en cultivos primarios de cerebro de *Dm*.**

Para poder medir los niveles de AMPc en cultivos, se utilizó un sensor basado en la proteína EPAC (Figura 7), el que se expresa bajo el control de UAS. Este sensor fue expresado en LA bajo control de distintos promotores.

La proteína EPAC posee dentro de su estructura dos dominios, uno asociado a una proteína fluorescente cyan (CFP) y la otra asociada a una proteína fluorescente amarilla (YFP). En ausencia de AMPc, ambos dominios fluorescentes se encuentran lo suficientemente próximos entre sí para producir el intercambio de energía conocido como FRET. Cuando hay AMPc presente, esta molécula interactúa con la proteína EPAC produciendo un cambio conformacional que disminuye considerablemente el FRET, produciendo un cambio en la razón de emisión CFP/YFP, lo que resulta en un aumento en la emisión de CFP (Figura 7). De esta forma, de manera cualitativa se pueden analizar los cambios en los niveles de AMPc expresados como la razón CFP/YFP, en cultivos primarios de neurona de mosca. Las células se observaron bajo el mismo microscopio spinning disc mencionado en la sección “imágenes de calcio” de materiales y métodos, con los respectivos filtros para CFP y YFP.

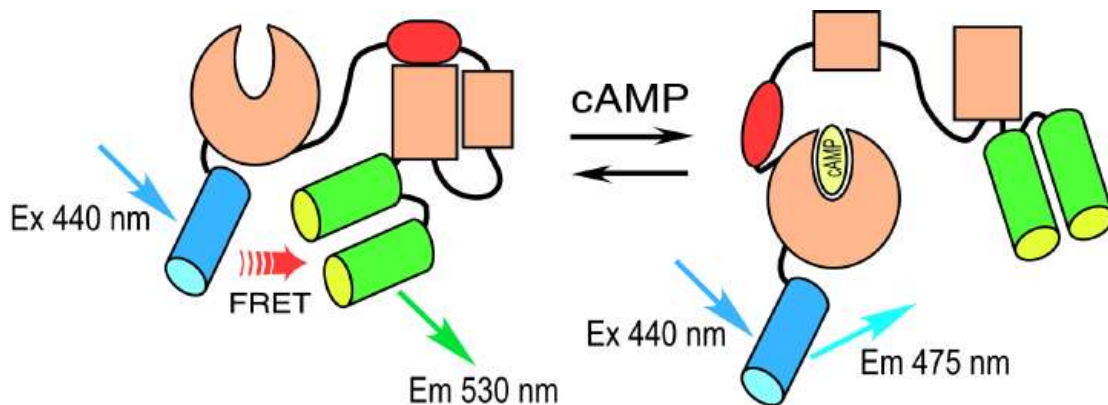


Figura 7. Diagrama esquemático del biosensor de AMPc basado en la proteína Epac. Epac, es una proteína capaz de interactuar con AMPc en su dominio regulador N-Terminal. Epac se pliega a bajas concentraciones de AMPc y responde al aumento de la unión de cAMP desplegándose. Una sonda FRET de cadena única, para detectar los niveles cambiantes de cAMP intracelular, se adiciona a la proteína Epac, expresando CFP (azul) e YFP (verde). En ausencia de AMPc, la proteína plegada permite el fenómeno de traspaso de energía lumínica desde CFP (donor) a YFP (aceptor), conocido como FRET (izquierda de la figura). La unión de cAMP al sensor Epac conduce a un gran cambio conformacional en la proteína. Esto provoca la separación de los fluoroforos (CFP e YFP), lo que lleva a una disminución en FRET y aumento respectivo de la emisión de la sonda donora (CFP) y consecuentemente una disminución de la emisión de la sonda aceptora. (Modificado de Hum et al., 2012).

#### 4.7 Experimentos conductuales.

Los experimentos conductuales fueron realizados en un T-maze (Cell Explorer Labs. Guangfu South Road, Taipei City, Taiwán) (figura 8). Se trabajó durante todo el curso del experimento en una sala de conducta condicionada a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , con una humedad relativa de 65-75% y bajo luz roja debido a que *Dm* presente fototaxismo positivo hacia la luz blanca. Se utilizaron moscas con rangos de edad que varían entre los 2 y 6 días. Los grupos de moscas controles y experimentales utilizados se señalan en la tabla 4.

Uno o dos días previos al experimento, las moscas se separaron en grupos de 35 animales. En el día del experimento, se ambientaron las moscas en sus

respectivos viales durante 15-30 min. en la sala de conducta, previamente condicionada. Las moscas fueron expuestas a dos corrientes de aire en el T-maze (1 Litro/min aproximadamente), una de ellas proveniente de una solución de benzaldehído 1:100 y 1:1000, en aceite mineral y la otra solo con aceite mineral. Ambas corrientes se distribuyen en cada uno de los brazos del T-maze, como se indica en la figura 8. Las moscas fueron expuestas a las corrientes de aire durante dos min. y posteriormente se analizó la cantidad de moscas que quedaron en cada uno de los brazos del T-maze; esto es para calcular un índice de respuesta (RI) dado por la siguiente fórmula:  $RI = (MO - BZ) / (MO + BZ)$

Donde MO representa a la cantidad de moscas que están en el brazo sin odorante y BZ las moscas que se encuentran en el brazo con benzaldehído.

Los datos fueron analizados con el programa Graphpad Prism 7.0.

Grupos controles	Grupos experimentales
W1118	W1118 Oct $\beta$ 3R
GH146 Gal4	RNAi mAChR-A en GH146
UAS-RNAi -mAChR-A	
GH146 Gal4 (NPs)	RNAi Oct $\beta$ 3R en GH146
UAS-RNAi Oct $\beta$ 3R	
GMR14H04 Gal4 (NLs)	RNAi -mAChR-A en GMR14H04
UAS-RNAi -mAChR-A	
GMR14H04 Gal4 (NLs)	RNAi Oct $\beta$ 3R en GMR14H04
UAS-RNAi Oct $\beta$ 3R	
OK66 Gal4 (LA + CFs)	RNAi -mAChR-A en OK66
UAS-RNAi -mAChR-A	
OK66 Gal4 (LA + CFs)	RNAi Oct $\beta$ 3R en Ok66
UAS-RNAi Oct $\beta$ 3R	

Tabla 4. Grupos experimentales utilizados en los experimentos conductuales. A la derecha, los grupos experimentales, con sus respectivos controles genéticos (a la izquierda).

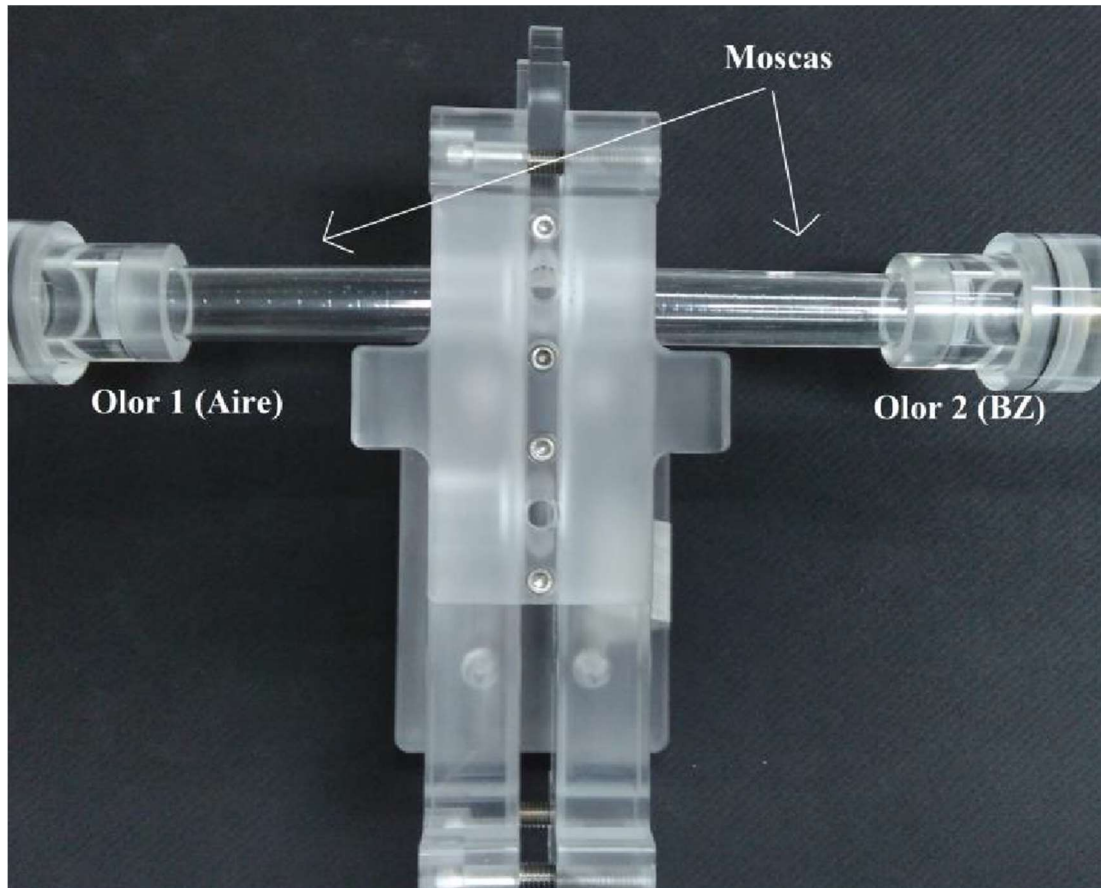


Figura 8. T-maze. Estructura en forma de T con dos brazos, uno para cada odorante. En este caso un brazo contiene aire (aceite mineral) y benzaldehído 1% (en aceite mineral). Se indica el espacio donde las moscas pueden transitar y decidir hacia que brazo del T-maze dirigirse.

#### 4.8 Análisis estadístico.

Los estudios estadísticos fueron realizados en GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Para cada set de datos se realizó prueba de normalidad D'Agostino-Pearson, cuando los datos se ajustaban a una distribución gaussiana, se utilizó una prueba paramétrica de T (T-test) para ver diferencias significativas entre 2 grupos y un ANOVA de una vía para ver diferencias significativas entre 3 grupos de datos o más. Cuando el set de datos no se ajustó a una distribución gaussiana o si el n estadístico fue insuficiente para

realizar una prueba de normalidad D'Agostino-Pearson (como en figura 10b y 11c), se verificaron diferencias significativas para 2 grupos de datos mediante un test Mann-Whitney (T-test no paramétrico) y para 3 o más grupos de datos se realizó un test Kurskal-Wallis (ANOVA no paramétrico). En todos los casos, se establecieron diferencias significativas con un valor  $p < 0,05$ . Todos los valores se presentan como promedio  $\pm$  ES (error estándar).

#### **4.9 Bioseguridad.**

Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité de bioseguridad de la facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, según lo establecido para el proyecto FONDECYT 1141233. El trabajo con moscas fue aprobado y supervisado por el Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG).

### **5. Resultados.**

#### **5.1 Evaluación y selección de promotores de expresión para poblaciones neuronales de LA.**

En LA podemos encontrar distintas poblaciones neuronales. Para poder comprender la funcionalidad de lóbulo antenal, ha sido necesario estudiar cada una de sus partes, por lo que se han generado distintas moscas transgénicas que expresan Gal4 en diferentes regiones de LA. De esta manera, mediante el sistema UAS/Gal4 y estudios de genética reversa, se ha logrado avanzar en la

compresión de los procesos llevados a cabo en esta región del cerebro de mosca. El promotor gh146-Gal4 se ha utilizado ampliamente en el estudio de neuronas de proyección (NPs) (Li et al., 2013, Acebes et al., 2012, Akerboom et al., 2012, entre otros) mientras que para neuronas locales (NLs), se han generado por separado, diferentes promotores dirigidos a zonas glomerulares o glomérulos específicos y son escasos los promotores dirigidos, de una forma más general, a la totalidad de neuronas locales de LA. En este sentido, ok66-Gal4 es uno de los promotores que más se ha usado para dirigir la expresión hacia NLs (Knight et al., 2010, Shuai et al., 2010, entre otros), pero al visualizar la expresión de GFP en moscas ok66-Gal4;UAS-GFP en un microscopio confocal, se observa que este promotor no sólo dirige la expresión hacia NLs, sino que también a otras regiones cerebrales como cuerpos fungiformes, aunque con menor intensidad (figura 9a). En este trabajo se utilizó el promotor GMR14H04 Gal4 para identificar NLs de LA. Este promotor fue generado en el contexto del proyecto FlyLight, realizado por un conjunto de laboratorios del Janelia Research Campus, en Virginia, EEUU. Este proyecto está focalizado en producir grandes conjuntos de datos anatómicos y colecciones altamente caracterizadas de controladores GAL4, LexA y Split-GAL4. Hasta la fecha no hay estudios que hayan dispuesto de este promotor. Al visualizar los cerebros de moscas GMR14H04-Gal4; UAS-GFP, se observó una muy buena expresión de GFP en NLs de LA y además con una muy buena especificidad (Figura 9b). Paralelamente, para la identificación de NPs se usaron moscas recombinantes que expresan GFP en NPs (gh146,

GFP). Adicionalmente en el laboratorio se tiene a disposición moscas recombinantes gh146 QF, QUAS Tomato, que expresan la proteína fluorescente Tomato en NPs. Se analizó la eficiencia de este promotor y se observó la alta expresión dirigida hacia NPs (figura 9c).

Así, para todos los experimentos de imágenes de calcio se utilizaron los promotores mencionados, con excepción de ok66 GAL4, para evitar confundir respuestas de CFs y LA.

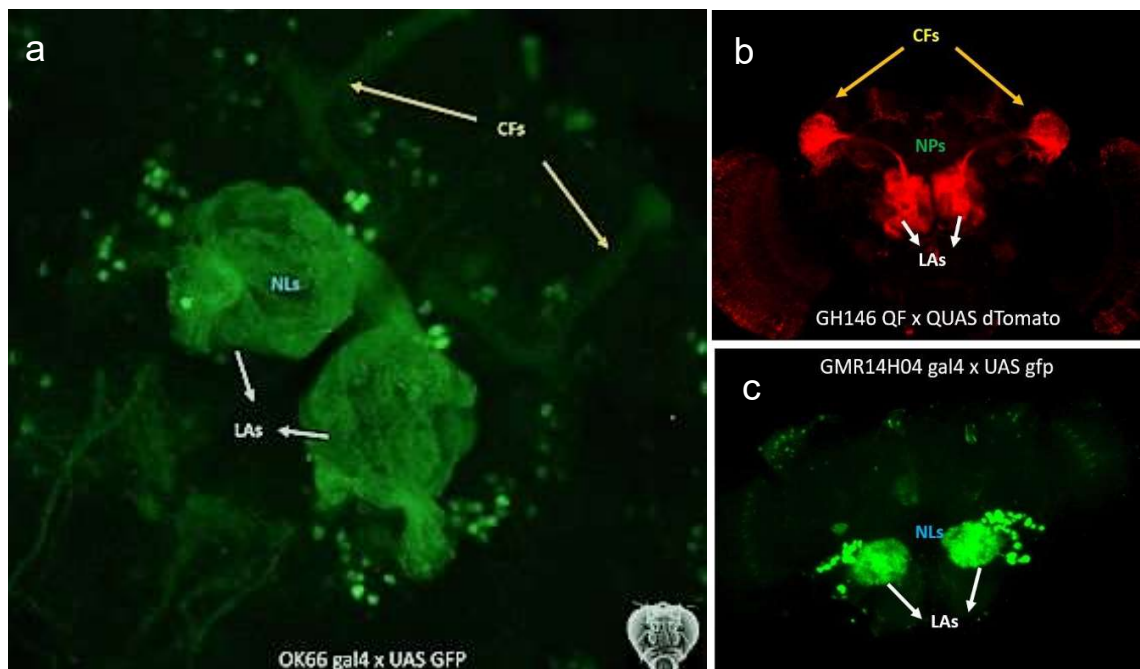


Figura 9. Expresión de GFP y Tomato, en distintas poblaciones neuronales de lóbulo antenal. a) Expresión de GFP bajo el control de promotor ok66, se observa una fuerte expresión en poblaciones neuronales de los glomérulos de lóbulo antenal (LAs, flechas blancas), se observa también, una tenue fluorescencia en la región de cuerpos fungiformes (CFs, amarillo). B) Expresión de GFP bajo control de GMR14H04, fuerte expresión en poblaciones neuronales de exclusiva residencia en LA (NL, neuronas locales, azul). C) Expresión de Tomato bajo control de GH146 QF. Se observan proyecciones axonales hacia CFs (flechas amarillas) y dendritas hacia LAs (flechas blancas).



## **5.2 Objetivo específico 1. Analizar las dinámicas de calcio intracelular asociadas a la activación de receptores muscarínicos de LA.**

### **5.2.1 Respuestas de calcio intracelular en NLs de LA mediadas por Acetilcolina.**

Para estudiar las respuestas de calcio intracelular en NLs de LA, se utilizaron moscas GMR14H04-Gal4, UAS-GFP. Cuando se agregó ACh 1 mM en cultivo, se observó un aumento significativo en los niveles de calcio intracelular, comparado con los niveles basales de calcio, previo al estímulo de ACh (figura 10a). Acetilcolina actúa mediante la activación de receptores nicotínicos (nAChR) (canales iónicos) y muscarínicos (metabotrópicos). Posterior a su activación, ambos receptores pueden modificar los niveles de calcio intracelular. Para poder diferenciar la contribución de mAChRs y nAChRs, se hicieron los cultivos con un bloqueador de los receptores nicotínicos (curare 1  $\mu$ M). Al comparar las respuestas ACh y Curare + ACh, no se observó una disminución significativa en las respuestas de calcio intracelular, cuando estaba presente Curare (Figura 10b).

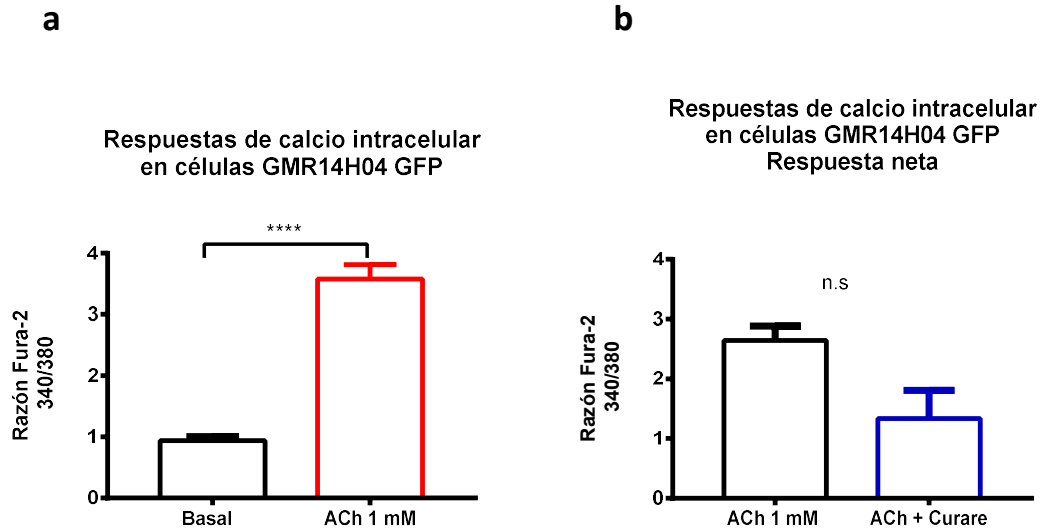


Figura 10. Activación colinérgica en NLs de lóbulo antenal. En la figura a, se muestra el aumento en los niveles de calcio intracelular (promedio  $\pm$  ES), frente a un estímulo de acetilcolina, comparado con los niveles de calcio intracelular previo al estímulo colinérgico (basal). N=32 células, 5 cultivos. En la Figura b, los cultivos fueron expuestos sólo a un agonista colinérgico, Acetilcolina 1 mM (ACh 1 mM), o a este ligando en presencia de un antagonista nicotínico, curare 1  $\mu$ M (ACh+curare); se muestran los niveles de calcio intracelular (promedio  $\pm$  ES) posterior a los estímulos correspondientes. N=32 células, 5 cultivos para ACh 1 mM y 4 células en 1 cultivo para ACh+curare. Los niveles de calcio intracelular se midieron en cultivos primarios de cerebro de mosca, según la razón Fura-2 340/380. Todos los experimentos fueron realizados en presencia de TTX. (a) Análisis T-test. (b) Análisis Mann-Whitney. \*\*\*\* indica  $P < 0,0001$ . n.s: No significativo, después de análisis estadístico.

## 5.2.2 Respuestas de calcio intracelular en NPs de LA mediadas por Acetilcolina.

Se analizaron las respuestas de calcio intracelular inducidas por ACh en NPs, mediante estudios de imágenes de calcio en cultivos primarios de neuronas de moscas gh146-Gal4, UAS-GFP y gh146-QF, Q-Tomato. Se optó por completar los experimentos de imágenes de calcio en NPs, con gh146-QF, Q-Tomato, ya que en algunos casos la expresión de GFP en cultivos gh146-Gal4 no fue la esperada. Se compararon los niveles basales de calcio intracelular en NPs con

los niveles de calcio posterior a un estímulo de ACh. Se evidenció un aumento significativo de calcio intracelular en ambos promotores para NPs (figura 11a y 11b). Dichas respuestas fueron disminuidas significativamente cuando se agregó, previo al estímulo de ACh, un antagonista nicotínico (curare) (figura 11c y d). Todo esto se observó en ambos grupos de moscas que identificaban NPs en cultivo. Estos resultados sugieren que NPs son capaces de responder a un estímulo de ACh mediante la activación de nAChrs y mAChrs.

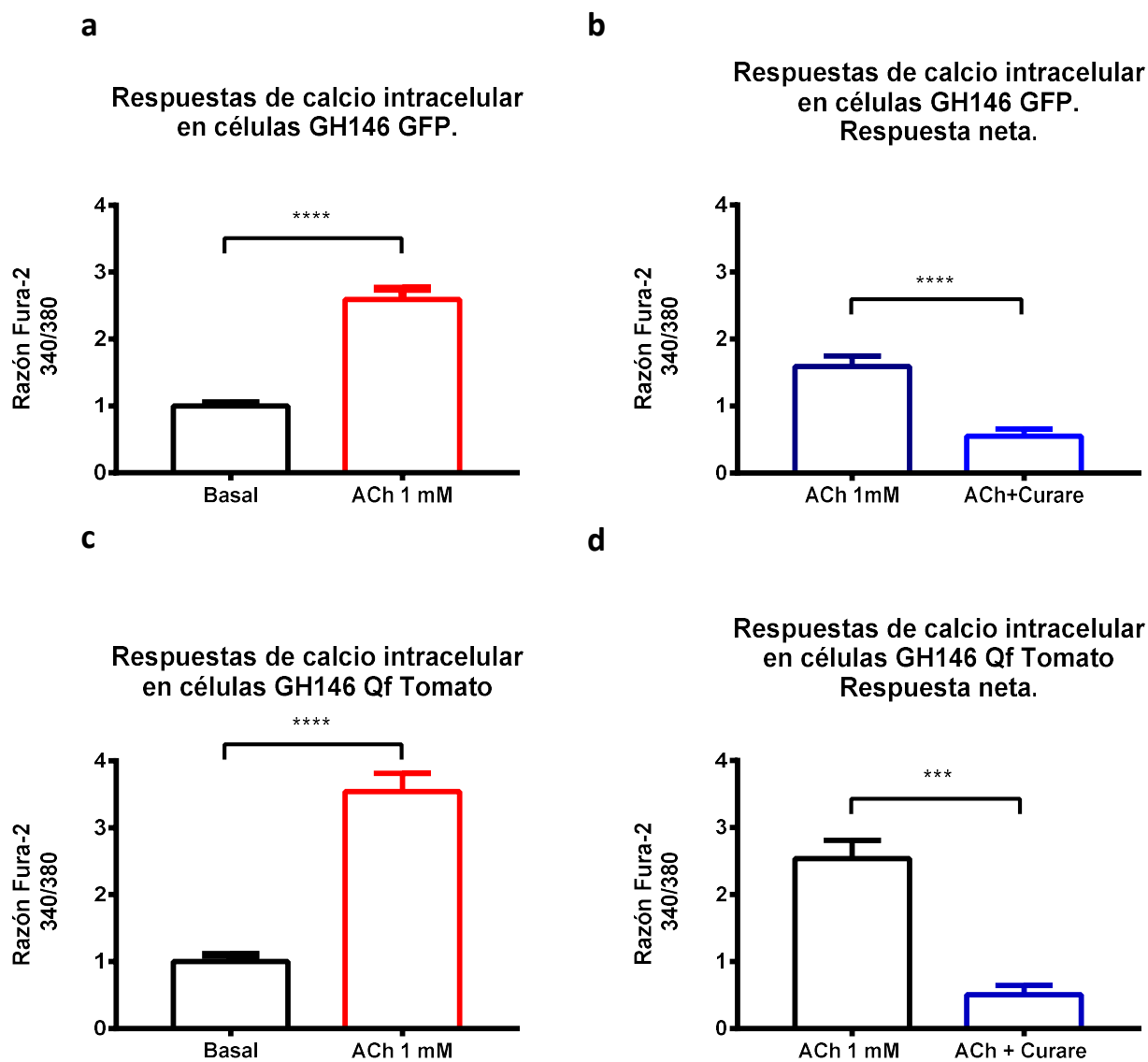


Figura 11. Respuestas a Acetilcolina dependen parcialmente de la activación de receptores nicotínicos en NPs. Cultivos primarios de NPs fueron expuestos sólo a un agonista colinérgico, Acetilcolina 1 mM (ACh 1 mM), o a este ligando en presencia de un antagonista nicotínico, curare 1  $\mu$ M (ACh+curare). Se analizaron las respuestas de calcio intracelular según la razón Fura-2 340/380 como promedio de respuesta  $\pm$  ES. (a) Neuronas de proyección: GH146 GFP. N= 75 células, en 7 cultivos para ACh y (b) 45 células, 3 cultivos para ACh + Curare. (c) Neuronas de proyección: GH146 Qf Tomato. N= 26 células, en 5 cultivos para ACh y (d) 4 células en 1 cultivo para ACh + Curare. Todos los experimentos fueron realizados en presencia de TTX. \*\*\* indica  $P < 0,005$ . \*\*\*\* indica  $P < 0,0001$ . Posterior a análisis Mann-Whitney.

### **5.2.3 Neuronas de proyección y locales de lóbulo antenal, manejan distintamente los niveles de calcio intracelular frente a un estímulo de acetilcolina.**

La dinámica en la regulación neural de NLs con NPs y NROs, es crucial para entender cómo la variabilidad de circuitos de NLs interactúan con la diversidad inhibitoria-excitatoria, permitiendo mejorar la capacidad codificante de las redes neuronales (Tsai et al., 2018). Para comprobar esta hipótesis, se compararon las respuestas de calcio intracelular entre NPs y NLs, se observa que los niveles de calcio posterior a un estímulo de acetilcolina son distintos en ambos grupos de neuronas (figura 12), siendo NLs las que logran llegar a niveles de calcio intracelular más altos que NPs.

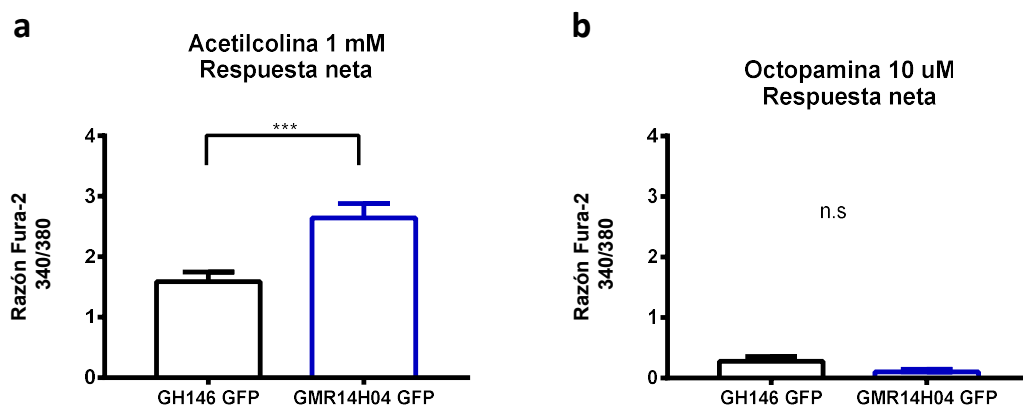


Figura 12. Respuestas diferenciales a acetilcolina de las dos subpoblaciones de neuronas de LA. Cultivos de dos poblaciones neuronales de Lóbulo antenal (GMR14H04 GFP, neuronas locales y GH146 GFP, neuronas de proyección) fueron expuestos a acetilcolina 1 mM (a) u octopamina 10uM (b). Se compararon los promedios de las respuestas de calcio intracelular  $\pm$  ES, expresados como razón Fura-2 340/380, entre las poblaciones neuronales, sin considerar los niveles basales de calcio intracelular. Datos mostrados provienen de (a) N= 67 células en 7 cultivos y 32 células en 5 cultivos, en NPs y NLs, respectivamente y de (b) N=78 células, en 5 cultivos y 10 células, en 2 cultivos. Todos los experimentos fueron realizados en presencia de TTX. \*\*\* indica  $P < 0,005$ . n.s: No significativo, valor  $p > 0,05$  Posterior a análisis Mann-Whitney.

### 5.3 Objetivo específico 2. Analizar las dinámicas de calcio intracelular asociadas a la activación de receptores octopaminérgicos en LA.

#### 5.3.1 Análisis de cambios en los niveles de calcio intracelular en respuesta a octopamina en NLs y NPs de LA.

Mediante imágenes de calcio en cultivos primarios de cerebro de mosca, se analizaron las respuestas de calcio en NLs y NPs al agregar octopamina 10uM en cultivos. En todos los casos, no se observaron diferencias significativas al comparar las respuestas de calcio intracelular posterior al estímulo de octopamina, con los niveles de calcio basales (figura 13a, 13b y 13c).

Estudios de los receptores octopaminérgicos de *Dm* (OctB1R, OctB2R y OctB3R), en sistemas heterólogos, sugieren una función similar a los receptores beta adrenérgicos de humanos y por consiguiente a cambios en los niveles de AMPc (Braudel Maqueira et al., 2005). Para analizar los cambios de AMPc en lóbulo antenal, mediante el sistema UAS/GAL4, se ha expresado la proteína EPAC en esta región del cerebro, para esto se utilizó el promotor gh146-Gal4. Se realizaron algunos experimentos en los cuales se utilizaron cultivos primarios de neuronas de mosca provenientes de la cruce entre gh146-Gal4 x UAS-EPAC, donde se evidencia la deficiente expresión de EPAC, comparada con otros promotores donde sí fue posible visualizar una buena expresión (figura 14). Consecuentemente se vio imposibilitado evidenciar cambios en la razón CFP/YFP cuando se agregó forskolina (activador selectivo del adenilato ciclasa). Buscar nuevos promotores o técnicas que permitan medir AMPc, se propone en este trabajo dentro de las proyecciones para avanzar en la descripción de los procesos celulares desencadenados en LA.

Por otra parte, anteriormente hemos descrito que las respuestas de calcio intracelular, inducidas por nicotina, se veían aumentadas de manera sinérgica, cuando se aplicaba en conjunto con OA, en neuronas de cuerpos fungiformes (Leyton et al. 2014). Para comprobar si dicho fenómeno acontece igualmente en células de LA, se analizaron las respuestas de calcio intracelular frente a un estímulo de ACh + OA. No se observaron diferencias significativas entre las respuestas de ACh y ACh + OA en NPs (figura 15).

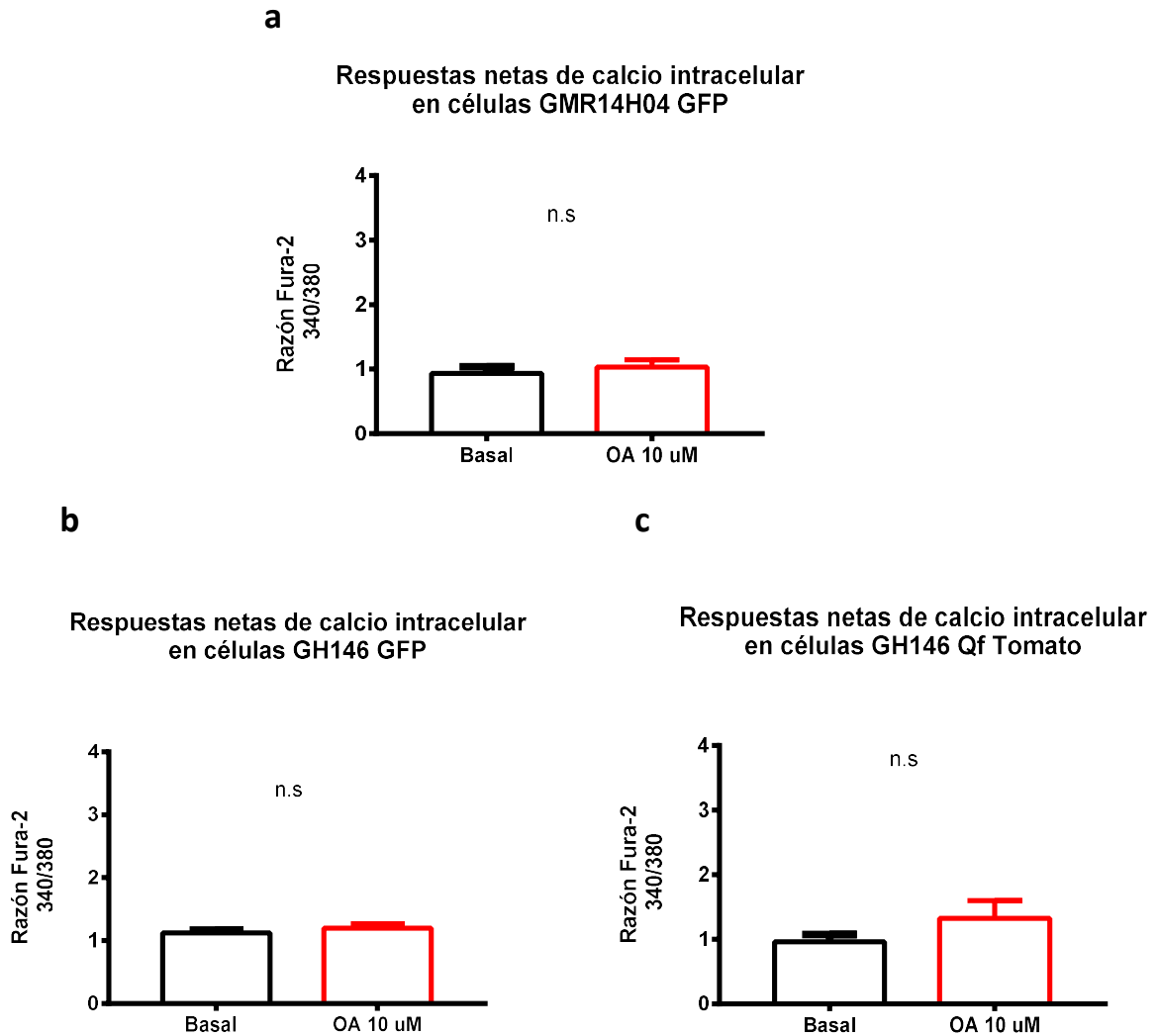


Figura 13. Activación octopaminérgica en diferentes poblaciones neuronales de lóbulo antenal. Neuronas de proyección GH146 (NP) y neuronas locales GMR14H04 (NL). Figuras a, b y c muestran los niveles de calcio intracelular (promedio  $\pm$  SEM) en presencia de octopamina, comparado con los niveles basales de calcio intracelular, previo al estímulo octopaminérgico. Para identificar NL se utilizaron moscas GMR14H04 GFP (a), N=10 células, 2 cultivos. Para identificar NP se utilizaron moscas gh146 GFP (b), N=78 células, 5 cultivos; y gh146QF Tomato (c), N=12 células, 4 cultivos. Los niveles de calcio intracelular se midieron en cultivos primarios de cerebro de mosca, según la razón Fura-2 340/380. Todos los experimentos fueron realizados en presencia de TTX. n.s: No significativo, valor  $p > 0,05$ ; Posterior a análisis Mann-Whitney.



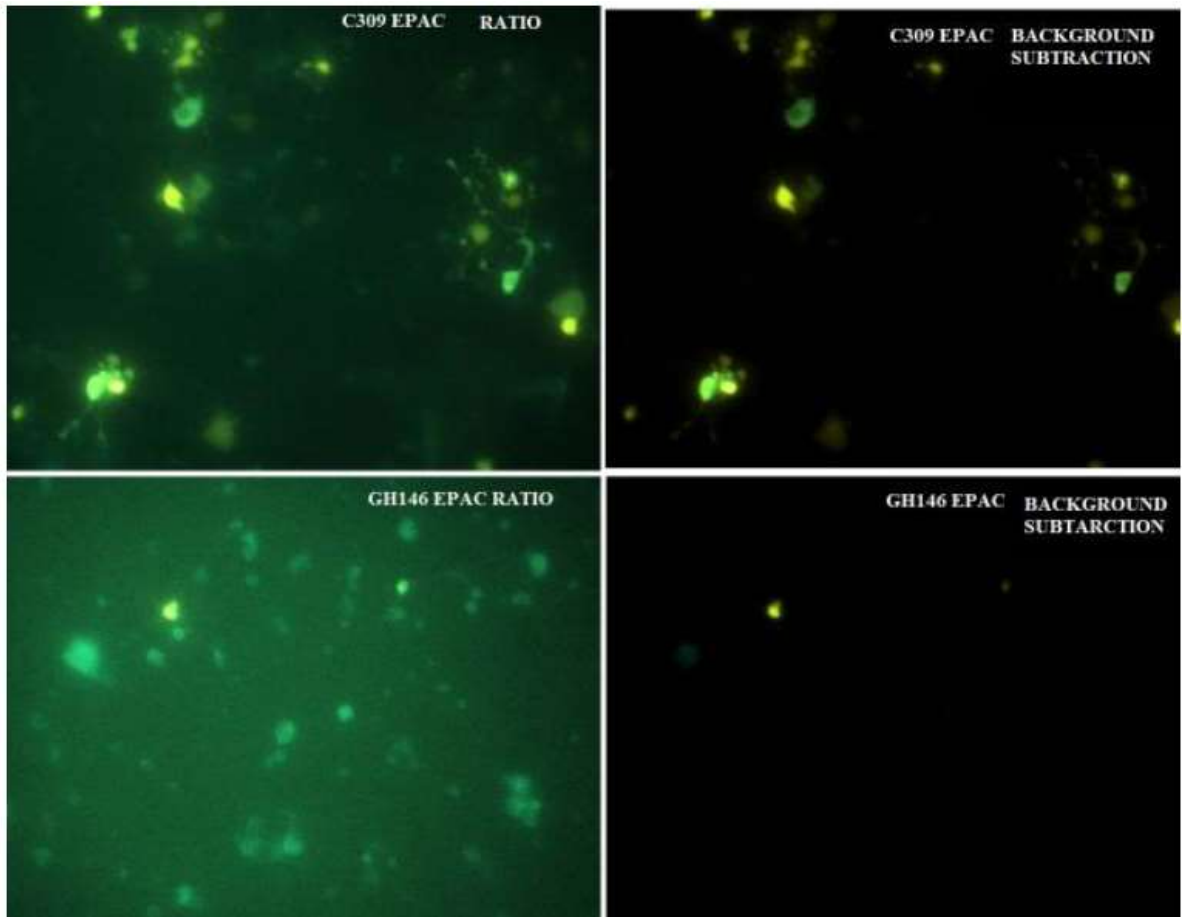


Figura 14. Comparación de la expresión de EPAC en cultivos primarios de *Drosophila*. Se muestra la expresión de EPAC bajo la dirección de dos promotores, uno para cuerpos fungiformes (C309, paneles superiores) ya utilizado en el laboratorio, y uno para neuronas de proyección de lóbulo antenal (GH146, paneles inferiores). Se observa la baja expresión de EPAC en GH146, que se evidencia al momento de substraer el background (paneles a la derecha en cada situación), lo que imposibilita realizar un análisis.

Respuestas de calcio intracelular  
en células GH146 GFP  
Respuesta neta

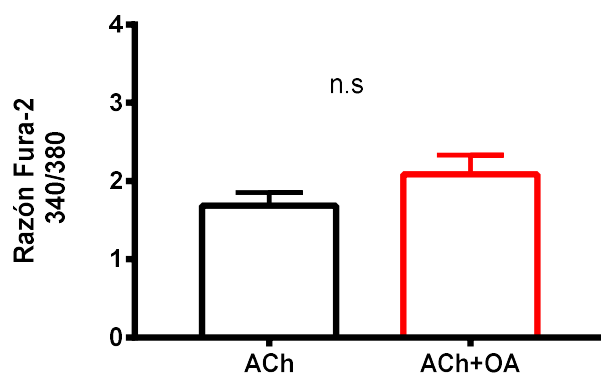


Figura 15. Respuestas de calcio intracelular en neuronas de proyección de lóbulo antenal. Comparación de las respuestas de calcio intracelular frente a acetilcolina (ACh, 1 mM) y acetilcolina + octopamina (ACh+OA). Las respuestas de calcio intracelular se midieron según la razón Fura-2 340/380 (promedio  $\pm$  SE). En el caso de ACh+OA, se  $\dot{\iota}$  35-40 seg. antes de la aplicación de ACh + OA 10  $\mu$ M. Datos obtenidos desde N=67 células en 7 cultivos y 58 células en 5 cultivos, en las condiciones ACh y ACh+OA, respectivamente. n.s: No significativo, valor  $p > 0,05$ : Posterior a análisis Mann-Whitney.

#### **5.4 Objetivo específico 3. Analizar la participación de receptores OctB3 y mACh de Lóbulo antenal, en el procesamiento de información olfativa.**

El último paso fue evaluar si efectivamente estos receptores presentes en LA están involucrados en el procesamiento de información olfatoria. Para esto mediante estudios conductuales se analizó el procesamiento de información olfativa a un odorante aversivo innato, benzaldehído, en un laberinto en T o t-maze. En una primera aproximación se comparó la aversión a benzaldehído (Bz) 1% y 0,1% en el mutante para el gen de OctB3R y el control genético W1118. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos con ambas concentraciones de Bz (figura 16a y 16b). Cabe considerar que la mutación afecta a la totalidad de las células de la mosca y no está dirigido a un tejido en particular y considerando que OctB3R posee una leve expresión en otras regiones de *Dm* (El-Kholy et al., 2015), mediante el sistema UAS/GAL se expresó un RNA interferente (RNAi) para el gen de OctB3R de manera específica en NPs y NLs de LA mediante los promotores ya utilizados. También se trabajó con el promotor ok66-gal4 que permite una fuerte expresión en NLs de LA y una leve expresión en CFs. Este último promotor permitiría diferenciar el efecto del RNAi en CFs y NLs ya que OctB3R también se expresa (pero menos que en LA) en CFs (El-Kholy et al., 2015). Para estos casos, se utilizó Bz 0,1%, ya que cuando se usó 1% se observaron índices de respuestas cercanos a 1, lo que indica que hay aversión en casi un 100% de las moscas y por ende se estaría trabajando con concentraciones de Bz cercanas al límite superior de la respuesta aversiva.

#### **5.4.1 Análisis de la participación de OctB3R en el procesamiento de la información olfativa, en distintas poblaciones neuronales de LA.**

Como se ha dicho, OctB3R tiene una sobresaliente expresión en neuronas de LA, sin embargo, se desconoce su función y participación asociada a esta región del cerebro de *Dm*. Para avanzar en esto se analizó el índice de respuestas (IR, ver métodos), mediante estudios conductuales, de moscas que expresaban el RNAi OctB3R en neuronas de proyección y neuronas locales de LA, y se compararon las respuestas con los respectivos controles UAS y Gal4. Para NPs, se observó un aumento en el IR respecto los controles, que se traduce en un aumento en la aversión (figura 17a). Por otro lado, no se observaron cambios en los IR de moscas que expresaban RNAi para OctB3R en los promotores GMR14H04 y ok66 (figura 17b y 17c).

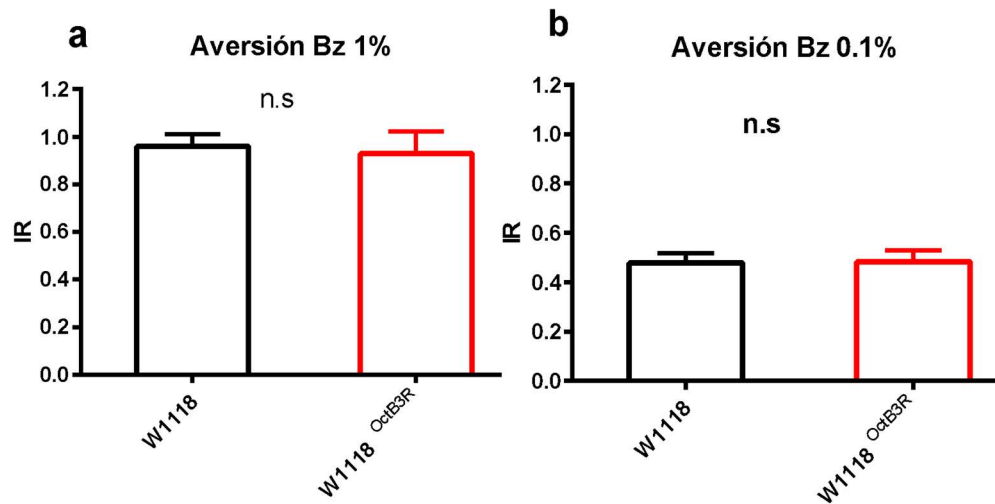


Figura 16. No se aprecian cambios en ensayo de aversión a benzaldehído en moscas mutantes para el receptor de octopamina beta 3 (OctB3R). Los gráficos muestran la aversión a benzaldehído (BZ), expresado como los promedios de los índices de respuesta, IR  $\pm$ SEM. Promedios de los IR en moscas controles y moscas mutantes para OctB3R, W1118 y W1118<sup>OctB3R</sup>, respectivamente. Estudios fueron realizados con (a) Bz 1% o (b) 0,1 % en aceite mineral. Datos obtenidos de N=6 experimentos distintos para cada cepa expuesta a Bz 1%, o en N=25 y 29 para cepas w1118 y w1118<sup>OctB3R</sup> expuestas a Bz 0.1%, respectivamente. n.s: No significativo, valor  $p > 0,05$ , posterior a t-test.

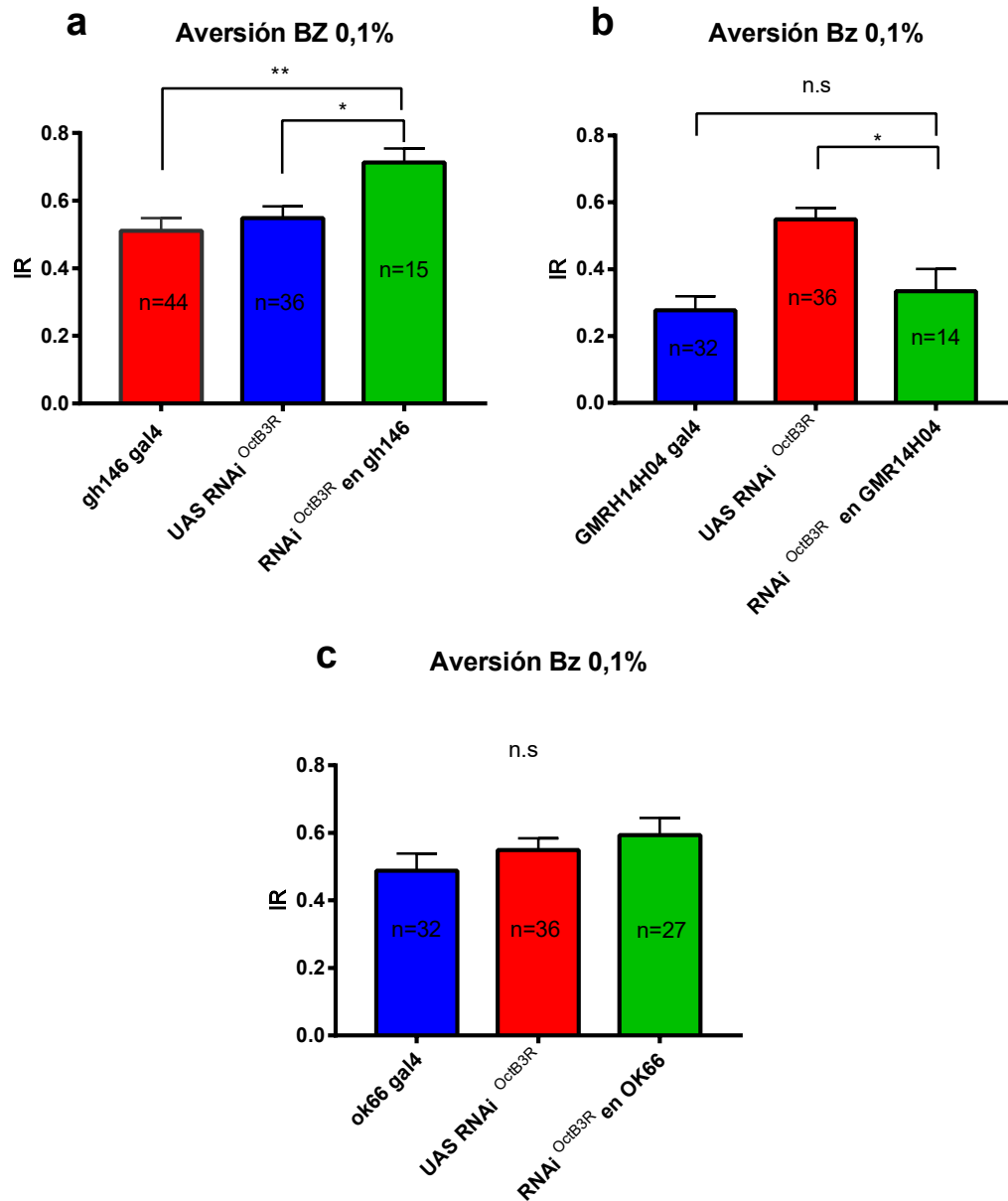


Figura 17. Ensayo de aversión a benzaldehído 0,1%, en moscas que dirigen la expresión de un RNAi para OctB3R en distintas poblaciones neuronales de lóbulo antenal: (a) gh146 para NPs, (b) GM14H04 para NL y (c) OK66 para NL y CFs). Los gráficos muestran la aversión a benzaldehído (BZ), expresado según los promedios de los índices de respuesta (IR) ( $\pm$ SEM), de los controles UAS y Gal4; y de las cruas respectivas. Se señala en cada gráfico los n estadísticos respectivos para cada condición. ANOVA de una vía. \* indica valor  $p < 0,05$ . \*\* indica valor  $p < 0,005$ . n.s = No significativo posterior a test ANOVA de una vía.

#### **5.4.2 Análisis de la participación de mAChRs en el procesamiento de la información olfativa, en distintas poblaciones neuronales de LA.**

Como ya se ha dicho ACh tiene un importante rol en el SNC de *Dm*. Se desconoce el rol que tienen componente colinérgicos asociados a receptores muscarínicos en una de las primeras regiones del procesamiento de la información en *Dm*. Para avanzar en esto, nuevamente, mediante estudios conductuales, se analizaron los IR de moscas, pero en este caso, que expresaban RNAi para el gen de  $\alpha$ -A en los tres promotores utilizados anteriormente, que dirigen la expresión hacia NLS, NPs y NLS + CFs. En todos los casos, no se observaron diferencias en los niveles de aversión, al comparar con los controles UAS y Gal4 (figura 18a, 18b y 18c). Sin embargo, se encontró que el IR en moscas que expresaban el interferente mediante el promotor ok66-Gal4, mostró diferencias significativas con uno de los controles. Esto posiblemente por la amplia distribución de este receptor en neuronas de CFs (Blake et al. 1993; Hannan y Hall, 1996).

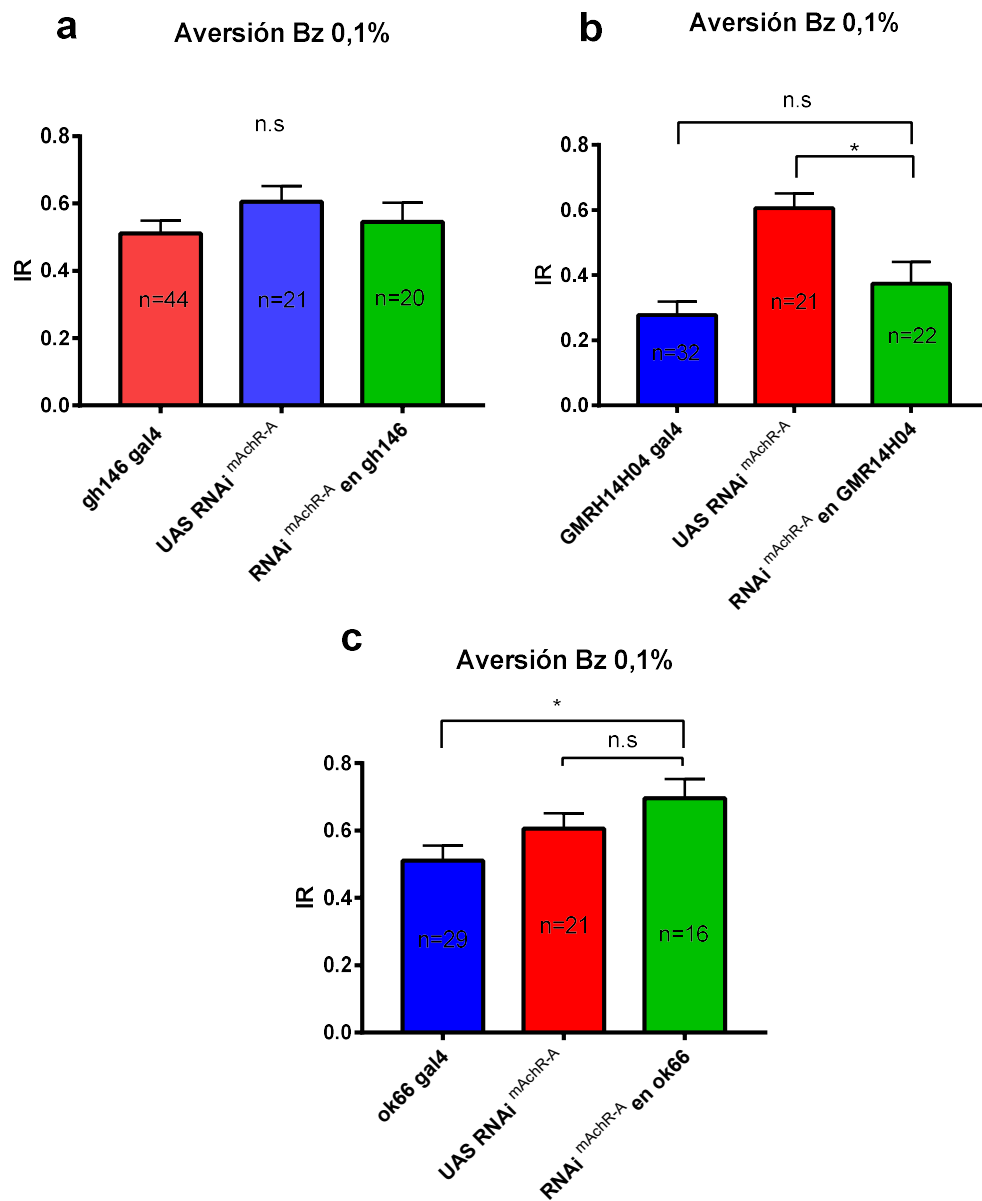


Figura 18. Ensayo de aversión a benzaldehído 0,1%, en moscas que dirigen la expresión de un RNAi para mAChR-A en distintas poblaciones neuronales de lóbulo antenal: (a) gh146 para NPs, (b) GM14H04 para NL y (c) OK66 para NL y CFs). Los gráficos muestran la aversión a benzaldehído (Bz), expresado según los promedios de los índices de respuesta (IR) ( $\pm$ SEM), de los controles UAS y Gal4; y de las cruas respectivas. Se señala en cada gráfico los n estadísticos respectivos para cada condición. (a) test Kurshall.Wallis. (b) y (c) test ANOVA de una vía. \* indica valor  $p < 0,05$ . n.s = No significativo, valor  $p > 0,05$ . Posterior a test Kurshall Wallis y test ANOVA de una vía.



## **6. Discusión**

### **6.1 Experimentos de imágenes de calcio.**

Uno de los objetivos principales de esta tesis, era incrementar nuestro conocimiento sobre cómo componentes colinérgicos y octopaminérgicos en el LA contribuyen al procesamiento de olores en *Dm*. Si bien, se conoce la naturaleza y distribución de los componentes que conforman LA de invertebrados y BO de mamíferos, existe poca información respecto a los procesos celulares que controlan el procesamiento de la información olfativa en esta región de cerebro. En un primer acercamiento se realizaron estudios de imágenes de calcio en NLS y NPs de LA.

#### **6.1.1 Acetilcolina produce cambios en los niveles de calcio intracelular en NPs mediadas por mAChR y nAChR.**

Al analizar las respuestas de calcio intracelular en NPs, frente a un estímulo colinérgico excitatorio como ACh, se observó un claro aumento de calcio intracelular que disminuyó significativamente cuando estaba presente un antagonista nicotínico (Curare). Esto sugiere que las señales colinérgicas excitatorias que llegan a NPs pueden ser moduladas por medio de nAChR y mAChR. La naturaleza de estos receptores le permitiría a NPs responder de manera diferencial a distintas señales provenientes del entorno, ya sea mediante una rápida transmisión sináptica excitatoria asociada a nAChR (Lee, 1999), que podría estar asociado a conductas innatas; o mediante la activación de

señalizaciones intracelulares vía segundos mensajeros como  $Ca^{+2}$  o AMPc (mAChR), que a su vez podrían estar asociados procesos que requieran perduración en el tiempo, como aprendizaje y memoria.

### **6.1.2 Acetilcolina produce cambios en los niveles de calcio intracelular en NLs de LA mediadas por mAChR y probablemente nAChR.**

Para aportar en la descripción de los procesos celulares asociados a actividad colinérgica excitatoria de NLs de LA se analizaron las respuestas inducidas por ACh en calcio intracelular. Estos experimentos se realizaron en presencia de Tetrodotoxina (TTX), para bloquear los potenciales de acción y la actividad secundaria indirecta en otras poblaciones neuronales. Los resultados acá mostrados, sugieren que NLs son capaces de responder a un estímulo de ACh, que se traduce en un aumento de los niveles de calcio intracelular. Se vio que dicho aumento se debe principalmente a la acción de mAChRs, ya que no se encontraron diferencias significativas en las respuestas de ACh y ACh + curare, a diferencia de lo que se vio en NPs. Sin embargo, considerando que el n estadístico para los experimentos de ACh + curare fue bajo (figura 10c) y que el análisis estadístico t-test, con un 95% de confiabilidad, dio un valor  $P=0,057$ ; resulta importante revisar estos experimentos con un “n” estadístico mayor, ya que con un mayor “n” se podrían ver diferencias significativas entre las respuestas de calcio a ACh y ACh + Curare en NLs.

### **6.1.3 Neuronas de proyección y locales de lóbulo antenal, manejan diferencialmente los niveles de calcio intracelular frente a un estímulo de acetilcolina.**

De forma paralela, mediante estudios de imágenes de calcio se analizaron las respuestas inducidas por un estímulo de ACh en NPs y se compararon con los cambios en los niveles de calcio intracelular asociados a ACh en NLs. Se observó claramente que los niveles de respuesta en NLs medidos como razón 340/380 son mayores que en NPs. Interesantemente, al comparar las curvas de respuesta de cultivos neuronales de NL y NPs, se observa que NPs alcanzan también niveles más altos de calcio intracelular posterior a la aplicación de ionomicina (figura 19). De estos resultados es posible concluir que NLs poseen respuestas mayores a un estímulo colinérgico que NPs. Considerando que una de las principales fuentes de actividad neuronal de las dos poblaciones neuronales en LA es la invasión colinérgica excitatoria que proviene de NROs, esta característica favorecería la capacidad de las dos poblaciones neuronales en LA de responder de manera diferencial a un mismo estímulo. Esta información podría ser de gran utilidad al momento de analizar la función de NLs en el contexto de la modulación de la información que es recibida en LA.

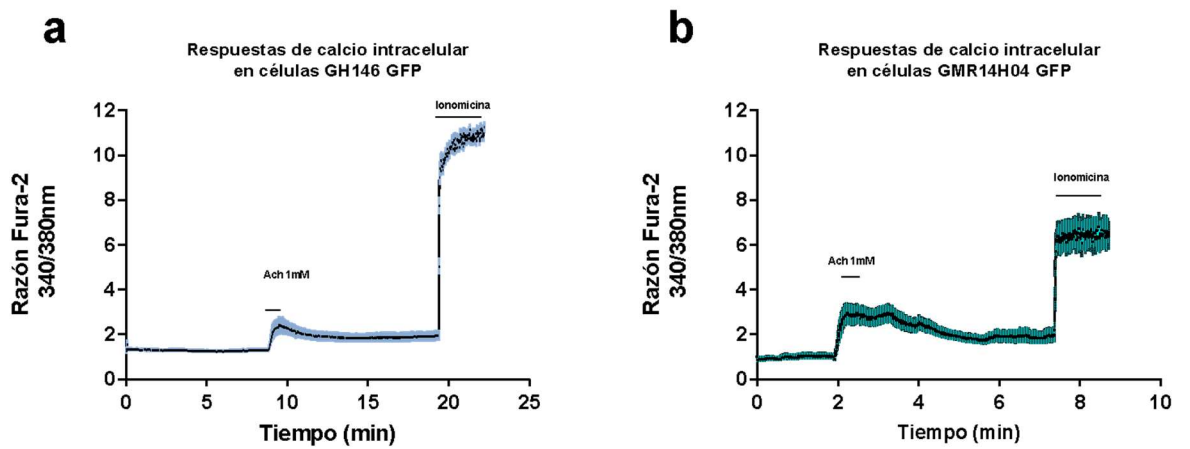


Figura 19. Curvas de los niveles de calcio intracelular en dos poblaciones neuronales de LA (+ SEM). En ambos casos se aplicó un estímulo de ACh 1 mM y posteriormente se aplicó ionomicina 1  $\mu$ M. (a) Curvas de las respuestas de calcio intracelular en células GH146 GFP, correspondiente a NPs (N=16 células). (b) Curvas de las respuestas de calcio intracelular en células GMR14H04 GFP, correspondiente a NLs (N=8 células).

#### 6.1.4 Octopamina no modula los niveles de calcio intracelular en LA de *Dm*.

Al analizar los cambios en los niveles de calcio intracelular inducidos por octopamina, no se evidenciaron cambios en ninguna de las poblaciones neuronales de LA analizadas en esta tesis. Estos resultados son consistentes con la idea de que OA ejerce una pobre influencia en la regulación de los niveles de calcio intracelular en neuronas de LA.

Si bien en LA existe una expresión importante de OctB3R, posiblemente este receptor podría estar asociado a señalización vía cambios en los niveles de AMPc (al igual que los otros dos receptores beta). Por otra parte, un cuarto receptor de octopamina, receptor de octopamina alfa 1 (u OAMB), sí ha sido asociado a cambios en niveles intracelulares de calcio (y eventualmente AMPc) en el SNC

de *Dm*, aunque su expresión en LA es considerablemente baja, al igual que la de OctB1R y OctB2R (El-Kholy S et al., 2015). Originalmente se había propuesto evaluar cambios en AMPc en NPs y NLs utilizando el biosensor basado en EPAC. Lamentablemente nuestros estudios demostraron que el nivel de señal detectable en NPs era muy pobre, lo que nos impidió evaluar esto.

Así, se requerirían nuevos promotores para una mejor expresión del biosensor, o alternativamente, nuevos biosensores para evaluar AMPc en neuronas de LA.

Anteriormente hemos descrito en neuronas de CFs, una sinergia en las respuestas de calcio intracelular inducidas por activación de receptores nicotínicos y octopaminérgicos (Leyton et al., 2014). Dicho fenómeno no se evidenció en NPs cuando se aplicó un estímulo colinérgico en presencia de octopamina. Esto permite concluir que octopamina no parece modular las dinámicas de calcio intracelular inducidas por receptores colinérgicos en NPs de LA.

## **6.2 Experimentos conductuales.**

Uno de los paradigmas conductuales más estudiado en el modelo de *Dm*, consiste en evaluar en un laberinto en T (T-maze), la capacidad discriminativa olfativa de *Dm* cuando se ve expuesta a dos señales de odorantes. Los resultados de imágenes de calcio revelaron una importante participación de mAChRs en el manejo de los niveles del segundo mensajero calcio, en NLs y NP de LA. A continuación, se evaluó la influencia que podrían tener componentes

colinérgicos y eventualmente octopaminérgicos en el procesamiento de la información olfatoria aversiva.

### **6.2.1 mAChRs no participan en el procesamiento de la información olfatoria a nivel de NPs y NLs.**

Cuando se expresó un RNAi para mAChR-A en NLs o NPs, no se modificó la aversión a benzaldehído, lo que indicaría que este receptor colinérgico no influye directamente en el procesamiento de la información olfativa aversiva. Esta es una herramienta genética que disminuye efectivamente la expresión de mAChR-A en aproximadamente 65% (tesis de Bioquímico de Bryon Silva), por lo que este resultado no parece explicarse en un deficiente a en la expresión del gen.

Interesantemente mAChR se expresa con mayor intensidad en otras regiones del cerebro de *Dm* como CFs. Como se mencionó anteriormente uno de los promotores ampliamente utilizados para dirigir la expresión de un gene de interés hacia LA, es el OK66-gal4, sin embargo cuando se analizó la expresión de GFP bajo el control de este promotor, se observó que también dirige la expresión hacia CFs. Interesantemente cuando se analizó la participación de mAChR-A utilizando este promotor, uno de los controles mostró diferencias significativas con moscas que expresaban RNAi para mAChR-A. Por lo que resulta importante confirmar la participación de mAChR-A de CFs, en el procesamiento de la información olfativa aversiva.

### **6.2.2 OctB3R de PNs, participa en el procesamiento de información olfativa aversiva, no así en NLs.**

Los resultados de los estudios conductuales de aversión en moscas que expresaban un RNAi para OctB3R, sugieren que OctB3R participa en el procesamiento de información olfativa de NPs, disminuyendo la aversión, ejerciendo una función del tipo inhibitoria. Esto confirma la idea de que NPs asociadas a conductas innatas (que inervan el asta lateral), están también relacionadas con una acción inhibitoria (Schultzhaus et al., 2017). Paralelamente no se observó participación de OctB3R en el procesamiento de la información olfatoria de neuronas locales y posiblemente neuronas de cuerpos fungiformes, sin embargo, para confirmar que efectivamente no participa en CFs se requieren más experimentos con promotores exclusivos para estas neuronas, como c309 Gal4 o Ok107 Gal4.

Esta información abre nuevas puertas respecto a la función que podría tener la actividad excitatoria colinérgica en LA, que podría estar enfocada en procesos de atracción y no aversión a olores, o, mejor dicho, modulando dichos procesos a través de interacción con otros componentes neuromoduladores distintos a OA, sin embargo, es necesario realizar más experimentos para comprobar dicha hipótesis.

## 7. Conclusión

En este trabajo, se describieron componentes colinérgicos y octopaminérgicos en lóbulo antenal, específicamente, asociadas a neuronas locales y de proyección. Los resultados indican que la actividad colinérgica de LA asociada a mAChR, está ampliamente relacionada con aumentos en los niveles de calcio intracelular en NLs y NPs. De manera particular, los resultados permiten proponer que mAChR contribuye en ambos grupos neuronales de LA, mientras que nAChR tiene mayor relevancia en NPs. Esto indica una modulación colinérgica diferencial en ambos grupos neuronales, que se comprobó al comparar las respuestas de calcio intracelular, posterior a un estímulo de ACh, entre NPs y NLs, y que se traduce en las diferencias funcionales de ambos grupos neuronales, en el contexto de LA. Interesantemente mAChR-A, receptor muscarínico con mayor participación en cerebro de *Dm*, no parece participar en el procesamiento de un estímulo olfativo aversivo a nivel de LA (NPs y NLs inclusive). Paralelamente la participación de OctB3R en el procesamiento de la información olfatoria parece ser importante en poblaciones neuronales de proyección, donde la ausencia de este receptor produjo un aumento en la aversión a benzaldehído. Señales octopaminérgicas no se asociaron a cambios en los niveles de calcio intracelular en LA. Posiblemente este receptor estaría actuando mediante mecanismos intracelulares asociados a cambios en los niveles de AMPc, lo cual no se logró



corroborar en este trabajo. Finalmente, los resultados en su conjunto aportan importante información respecto a los procesos celulares que participan en el procesamiento de la información olfativa y que hasta la fecha habían sido poco estudiados.

### **Proyecciones.**

Los resultados de esta tesis, abren nuevas puertas e interrogantes en el estudio del procesamiento de la información olfativa en lóbulo antenal de *Dm*. Una de ellas, se relaciona con la contribución octopaminérgica en esta región del cerebro. Para avanzar en esto, dentro las proyecciones de este trabajo, se propone evaluar cambios de AMPc intracelular, ya que en estudios de expresión heteróloga, se ha visto que uno de los receptores de octopamina más expresados en LA de *Dm* (OctB3R), está posiblemente asociado a cambios en los niveles de AMPc intracelular. Además también se propone evaluar cambios de calcio intracelular en ausencia de calcio extracelular frente a un estímulo octopaminérgico, esto debido a que posibles cambios en los niveles de AMPc, podrían también modificar las dinámicas de calcio intracelular asociadas a reservorios intracelulares (retículo, mitocondria, otros). También, según la información en la literatura, se ha visto que gran parte de la información olfativa innata está dirigida hacia neuronas de asta lateral, donde coincidentemente llegan poblaciones neuronales de NPs de tipo inhibitorias (principalmente GABAérgicas); en los resultados de este trabajo se vio que la acción del receptor

OctB3R en NPs disminuye la aversión a Bz, lo que se asemeja con una modulación de tipo inhibitoria, por lo que evaluar la participación de este receptor en las respuestas celulares inducidas en neuronas de asta lateral a través de NPs, podría dar indicios de acciones inhibitorias aminérgicas en esta zona del cerebro de *Dm*. Por otra parte, en las proyecciones de esta tesis, se propone también realizar experimentos conductuales en moscas que dirijan la expresión de RNAi mAChR-A exclusivamente a poblaciones de CFs, ya que se observó que en uno de los controles tiene diferencias significativas respecto de las moscas que expresaban en RNAi en OK66-gal4. También resulta necesario evaluar la participación de nAChR en este mismo contexto de lóbulo antenal, ya que en los resultados de imágenes de calcio se evidenció participación de componentes colinérgicos nicotínicos y muscarínicos en las respuestas de NPs.

## 7. Bibliografía

- Acebes, A., Devaud, J.-M., Arnes, M., & Ferrus, A. (2012). Central Adaptation to Odorants Depends on PI3K Levels in Local Interneurons of the Antennal Lobe. *Journal of Neuroscience*, 32(2), 417–422.
- Ache, B. W., & Young, J. M. (2005). Olfaction: Diverse species, conserved principles. *Neuron*, 48(3), 417–430.
- Akerboom, J., Chen, T.-W., Wardill, T. J., Tian, L., Marvin, J. S., Mutlu, S., ... Looger, L. L. (2012). Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging. *Journal of Neuroscience*, 32(40), 13819–13840.
- Bargmann, C. I. (2006). Comparative chemosensation from receptors to ecology. *Nature*, 444(7117), 295–301.
- Bicker, G. (1999). Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microscopy Research and Technique*, 45(3), 174–183.
- Billeter, J. C., & Levine, J. D. (2013). Who is he and what is he to you? Recognition in *Drosophila melanogaster*. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(1), 17–23.
- Blake, a D., Anthony, N. M., Chen, H. H., Harrison, J. B., Nathanson, N. M., & Sattelle, D. B. (1993). *Drosophila* nervous system muscarinic acetylcholine receptor: transient functional expression and localization by immunocytochemistry. *Molecular Pharmacology*, 44(4), 716–724.
- Brandt, A., & Vilcinskis, A. (2013). The Fruit Fly *Drosophila melanogaster* as a Model for Aging Research BT - Yellow Biotechnology I: Insect Biotechnologie in Drug Discovery and Preclinical Research. In A. Vilcinskis (Ed.) (pp. 63–77). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Breer, H., & Sattelle, D. B. (1987). Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors. *Journal of Insect Physiology*, 33(11), 771–790.
- Brembs, B. (2013). Invertebrate behavior-actions or responses? *Frontiers in Neuroscience*, 7(7 NOV), 1–2.
- Brennan, P. A., & Keverne, E. B. (1997). Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Progress in Neurobiology*, 51(4), 457–481.
- Buck, L., & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), 175–187.

- Burke, C. J., Huetteroth, W., Oswald, D., Perisse, E., Michael, J., Das, G., Waddell, S. (2013). NIH Public Access, 492(7429), 433–437.
- Bushdid, C., Magnasco, M. O., Vosshall, L. B., & Keller, A. (2015). HHS Public Access, 343(6177), 1370–1372.
- Busto, G. U., Cervantes-Sandoval, I., & Davis, R. L. (2010). Olfactory Learning in *Drosophila*. *Physiology*, 25(6), 338–346.
- Chen, C. C., Wu, J. K., Lin, H. W., Pai, T. P., Fu, T. F., Wu, C. L., ... Ferrus, A. (2013). Olfaction: Diverse species, conserved principles. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(1), 716–724.
- Chou, Y. H., Spletter, M. L., Yaksi, E., Leong, J. C. S., Wilson, R. I., & Luo, L. (2010). Diversity and wiring variability of olfactory local interneurons in the *Drosophila* antennal lobe. *Nature Neuroscience*, 13(4), 439–449.
- Cognigni, P., Felsenberg, J., & Waddell, S. (2018). Do the right thing: neural network mechanisms of memory formation, expression and update in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, 49, 51–58.
- Collin, C., Hauser, F., De Valdivia, E. G., Li, S., Reisenberger, J., Carlsen, E. M. M., ... Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2013). Two types of muscarinic acetylcholine receptors in *Drosophila* and other arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(17), 3231–3242.
- El-Kholy, S., Stephano, F., Li, Y., Bhandari, A., Fink, C., & Roeder, T. (2015). Expression analysis of octopamine and tyramine receptors in *Drosophila*. *Cell and Tissue Research*, 361(3), 669–684.
- Engel, A. K., Konig, P., Gray, C. M., & Singer, W. (1990). Stimulus-dependent neuronal oscillations in cat visual cortex: inter-columnar interaction as determined by cross-correlation analysis. *Eur J Neurosci*, 2(7), 588–606.
- Fiala, A. (2007). Olfaction and olfactory learning in *Drosophila*: recent progress. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(6), 720–726.
- Galizia, C. G., Sachse, S., Rappert, A., & Menzel, R. (1999). The glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Neuroscience*, 2(5), 473–478.
- Getz, W. M., & Akers, R. P. (1994). Honeybee olfactory sensilla behave as integrated processing units. *Behavioral and Neural Biology*, 61(2), 191–195.

- Goaillard, J. M., Taylor, A. L., Schulz, D. J., & Marder, E. (2009). Functional consequences of animal-to-animal variation in circuit parameters. *Nature Neuroscience*, *12*(11), 1424–1430.
- Goldman, A. L., Van Der Goes Van Naters, W., Lessing, D., Warr, C. G., & Carlson, J. R. (2005). Coexpression of two functional odor receptors in one neuron. *Neuron*, *45*(5), 661–666.
- Gu, H. (2006). Cholinergic Synaptic Transmission in Adult *Drosophila* Kenyon Cells In Situ. *Journal of Neuroscience*, *26*(1), 265–272.
- Gundelfinger, E. D. (1992). How complex is the nicotinic receptor system of insects? *Trends in Neurosciences*, *15*(6), 206–211.
- Gupta, N., & Stopfer, M. (2011). Insect olfactory coding and memory at multiple timescales. *Current Opinion in Neurobiology*, *21*(5), 768–773.
- Güven-Ozkan, T., & Davis, R. L. (2014). Functional neuroanatomy of *Drosophila* olfactory memory formation. *Learning and Memory*, *21*(10), 519–526.
- Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuenta, A. M., & Roberts, D. M. (2015). Genetics on the fly: A primer on the *Drosophila* model system. *Genetics*, *201*(3), 815–842.
- Han, K. A., Millar, N. S., & Davis, R. L. (1998). A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *The Journal of Neuroscience*, *18*(10), 3650–3658.
- Hannan, F., & Hall, L. M. (1996). Temporal and spatial expression patterns of two G-protein coupled receptors in *Drosophila melanogaster*. *Invertebrate Neuroscience*, *2*(1), 71–83.
- Haverkamp, A., Hansson, B. S., & Knaden, M. (2018). Combinatorial codes and labeled lines: How insects use olfactory cues to find and judge food, mates, and oviposition sites in complex environments. *Frontiers in Physiology*, *9*(FEB), 1–8.
- Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*, 266.
- Hum, J. M., Siegel, A. P., Pavalko, F., & Day, R. (2012). Monitoring biosensor activity in living cells with fluorescence lifetime imaging microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Iliadi, K. G., Iliadi, N., & Boulianne, G. L. (2017). *Drosophila* mutants lacking octopamine exhibit impairment in aversive olfactory associative learning. *European Journal of Neuroscience*, *46*(5), 2080–2087.

- Jorge M. Campusano, Hailing Su, Shaojuan A. Jiang, Beatriz Sicaeros, D. K. O. (2007). nAChR-Mediated Calcium Responses and Plasticity in Drosophila Kenyon Cells. *Developmental Neurobiology*, 67, 1520–1532.
- Joseph, R. M., & Carlson, J. R. (2015). Drosophila Chemoreceptors: A Molecular Interface Between the Chemical World and the Brain. *Trends in Genetics*, 31(12), 683–695.
- Kakidani, H., & Ptashne, M. (1988). GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell*, 52(2), 161–167.
- Kazama, H., & Wilson, R. I. (2008). Homeostatic matching and nonlinear amplification at identified central synapses. *Neuron*, 58(3), 401–413.
- Kim, Y.-C., Lee, H.-G., & Han, K.-A. (2007). Dopamine Receptor dDA1 Is Required in the Mushroom Body Neurons for Aversive and Appetitive Learning in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 27(29), 7640 LP-7647.
- Knight, D., Harvey, P. J., Iliadi, K. G., Klose, M. K., Iliadi, N., Dolezelova, E., ... Boulianne, G. L. (2010). Equilibrative Nucleoside Transporter 2 Regulates Associative Learning and Synaptic Function in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 30(14), 5047 LP-5057.
- Kurtovic, A., Widmer, A., & Dickson, B. J. (2007). A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a Drosophila sex pheromone. *Nature*, 446, 542.
- Laurent, G., & Naraghi, M. (1994). Odorant-induced oscillations in the mushroom bodies of the locust. *The Journal of Neuroscience*, 14(5), 2993 LP-3004.
- Laurent, G. (1996). Dynamical representation of odors by oscillating and evolving neural assemblies. *Trends in Neurosciences*, 19(11), 489–496.
- Laurent, G. (2002). Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(11), 884–895.
- Lee, D., & O'Dowd, D. K. (1999). Fast Excitatory Synaptic Transmission Mediated by Nicotinic Acetylcholine Receptors in *Drosophila* Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 19(13), 5311 LP-5321.
- Leyton, V., Goles, N. I., Fuenzalida-Uribe, N., & Campusano, J. M. (2014). Octopamine and Dopamine differentially modulate the nicotine-induced calcium response in Drosophila Mushroom Body Kenyon Cells. *Neuroscience Letters*, 560, 16–20.

- Li, Y., Hoxha, V., Lama, C., Dinh, B. H., Vo, C. N., & Dauwalder, B. (2011). The hector G-Protein Coupled Receptor Is Required in a Subset of fruitless Neurons for Male Courtship Behavior. *PLOS ONE*, 6(11), e28269.
- Liang, L., Li, Y., Potter, C. J., Yizhar, O., Deisseroth, K., Tsien, R. W., & Luo, L. (2013). GABAergic projection neurons route selective olfactory inputs to specific higher-order neurons. *Neuron*, 79(5), 917–931.
- Liu, C., Plaçais, P.-Y., Yamagata, N., Pfeiffer, B. D., Aso, Y., Friedrich, A. B., ... Tanimoto, H. (2012). A subset of dopamine neurons signals reward for odour memory in *Drosophila*. *Nature*, 488, 512.
- Lizbinski, K. M., & Dacks, A. M. (2018). Intrinsic and Extrinsic Neuromodulation of Olfactory Processing. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 424.
- MacLeod, K., & Laurent, G. (1996). Distinct Mechanisms for Synchronization and Temporal Patterning of Odor-Encoding Neural Assemblies. *Science*, 274(5289), 976 LP-979.
- Maqueira, B., Chatwin, H., & Evans, P. D. (2005). Identification and characterization of a novel family of *Drosophila*  $\beta$ -adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. *Journal of Neurochemistry*, 94(2), 547–560.
- Menniti, D., Scordino, N., & Sorrentino, N. (2006). A new method for SSSC optimal location to improve power system Available Transfer Capability. *2006 IEEE PES Power Systems Conference and Exposition, PSCE 2006 - Proceedings*, 96, 938–945.
- Mery, F., Varela, S. A. M., Danchin, É., Blanchet, S., Parejo, D., Coolen, I., & Wagner, R. H. (2009). Public Versus Personal Information for Mate Copying in an Invertebrate. *Current Biology*, 19(9), 730–734.
- Millar, N. S., Baylis, H. A., Reaper, C., Bunting, R., Mason, W. T., & Sattelle, D. B. (1995). Functional expression of a cloned *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor in a stable *Drosophila* cell line. *The Journal of Experimental Biology*, 198(9), 1843 LP-1850.
- Mollereau, B., & Ma, D. (2014). The p53 control of apoptosis and proliferation: lessons from *Drosophila*. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 19(10), 1421–1429.
- Niimura, Y. (2009). Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in chordates: interaction between environments and genomic contents. *Human Genomics*, 4(2), 107–118.

- Niimura, Y., Matsui, A., & Touhara, K. (2014). Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals. *Genome Research*, 24(9), 1485–1496.
- Okada, R., Awasaki, T., & Ito, K. (2009). Gamma-aminobutyric acid (GABA)-mediated neural connections in the *Drosophila* antennal lobe. *Journal of Comparative Neurology*, 514(1), 74–91.
- Olsen, S. R., & Wilson, R. I. (2008). Lateral presynaptic inhibition mediates gain control in an olfactory circuit. *Nature*, 452(7190), 956–960.
- Owald, D., & Waddell, S. (2015). Olfactory learning skews mushroom body output pathways to steer behavioral choice in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, 35, 178–184.
- Padmanabhan, K., & Urban, N. N. (2010). Intrinsic biophysical diversity decorrelates neuronal firing while increasing information content. *Nature Neuroscience*, 13(10), 1276–1282.
- Pirrota, V. (1988). CHAPTER 22 - Vectors for P-Mediated Transformation in *Drosophila*. In R. L. Rodriguez & D. T. B. T.-V. Denhardt (Eds.) (pp. 437–456). Butterworth-Heinemann.
- Potter, C. J., Tasic, B., Russler, E. V., Liang, L., & Luo, L. (2010). The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell*, 141(3), 536–548.
- Qin, H., Cressy, M., Li, W., Coravos, J. S., Izzi, S. A., & Dubnau, J. (2012). Gamma neurons mediate dopaminergic input during aversive olfactory memory formation in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, 22(7), 608–614.
- Rein, J., Mustard, J. A., Strauch, M., Smith, B. H., & Galizia, C. G. (2013). Octopamine modulates activity of neural networks in the honey bee antennal lobe. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 199(11), 947–962.
- Ren, G. R., Folke, J., Hauser, F., Li, S., & Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2015). The A- and B-type muscarinic acetylcholine receptors from *Drosophila melanogaster* couple to different second messenger pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462(4), 358–364.
- Riabinina, O., Luginbuhl, D., Marr, E., Liu, S., Wu, M. N., Luo, L., & Potter, C. J. (2015). Improved and expanded Q-system reagents for genetic manipulations. *Nature Methods*, 12(3), 219–222.



- Rollmann, S. M., Wang, P., Date, P., West, S. A., Mackay, T. F. C., & Anholt, R. R. H. (2010). Odorant receptor polymorphisms and natural variation in olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *186*(2), 687–697.
- Root, C. M., Masuyama, K., Green, D. S., Enell, L. E., Nässel, D. R., Lee, C.-H., & Wang, J. W. (2008). A presynaptic gain control mechanism fine-tunes olfactory behavior. *Neuron*, *59*(2), 311–321.
- Rubin, G. M. (1988). *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science*, *240*(4858), 1453 LP-1459.
- Rudrapatna, V. A., Cagan, R. L., & Das, T. K. (2012). *Drosophila* cancer models. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *241*(1), 107–118.
- Sachse, S., & Beshel, J. (2016). The good, the bad, and the hungry: how the central brain codes odor valence to facilitate food approach in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, *40*, 53–58.
- Schultzhaus, J. N., Saleem, S., Iftikhar, H., & Carney, G. E. (2017). The role of the *Drosophila* lateral horn in olfactory information processing and behavioral response. *Journal of Insect Physiology*, *98*, 29–37.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., & Heisenberg, M. (2003). Dopamine and Octopamine Differentiate between Aversive and Appetitive Olfactory Memories in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, *23*(33), 10495 LP-10502.
- Scott, A. M., Dworkin, I., & Dukas, R. (2018). Sociability in Fruit Flies: Genetic Variation, Heritability and Plasticity. *Behavior Genetics*, *48*(3), 247–258.
- Semmelhack, J. L., & Wang, J. W. (2009). Select *Drosophila* glomeruli mediate innate olfactory attraction and aversion. *Nature*, *459*(7244), 218–223.
- Sen, A., Shetty, C., Jhaveri, D., & Rodrigues, V. (2005). Distinct types of glial cells populate the *Drosophila* antenna. *BMC Developmental Biology*, *5*, 25.
- Shapiro, R. A., Wakimoto, B. T., Subers, E. M., & Nathanson, N. M. (1989). Characterization and functional expression in mammalian cells of genomic and cDNA clones encoding a *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(22), 9039–9043.
- Shipley, M. T., & Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system. *Journal of Neurobiology*, *30*(1), 123–176.

- Shuai, Y., Lu, B., Hu, Y., Wang, L., Sun, K., & Zhong, Y. (2010). Forgetting Is Regulated through Rac Activity in *Drosophila*. *Cell*, *140*(4), 579–589.
- Silva, B., Molina-Fernández, C., Ugalde, M. B., Tognarelli, E. I., Angel, C., & Campusano, J. M. (2015). Muscarinic ACh Receptors Contribute to Aversive Olfactory Learning in *Drosophila*. *Neural Plasticity*, *2015*, 658918.
- Simon, A. F., Chou, M.-T., Salazar, E. D., Nicholson, T., Saini, N., Metchev, S., & Krantz, D. E. (2012). A simple assay to study social behavior in *Drosophila*: measurement of social space within a group. *Genes, Brain, and Behavior*, *11*(2), 243–252.
- Singer, W., & Gray, C. M. (1995). Visual Feature Integration and the Temporal Correlation Hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*, *18*(1), 555–586.
- Stocker, R. F. (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell and Tissue Research*, *275*(1), 3–26.
- Stocker, R. F., Heimbeck, G., Gendre, N., & De Belle, J. S. (1997). Neuroblast ablation in *Drosophila* P[GAL4] lines reveals origins of olfactory interneurons. *Journal of Neurobiology*, *32*(5), 443–456.
- Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, B. H., & Laurent, G. (1997). Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature*, *390*, 70.
- Strube-Bloss, M. F., Grabe, V., Hansson, B. S., & Sachse, S. (2017). Calcium imaging revealed no modulatory effect on odor-evoked responses of the *Drosophila* antennal lobe by two populations of inhibitory local interneurons. *Scientific Reports*, *7*(1), 7854.
- Su, C.-Y., Menuz, K., & Carlson, J. R. (2009). Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell*, *139*(1), 45–59.
- Su, H., & O'Dowd, D. K. (2003). Fast Synaptic Currents in *Drosophila* Mushroom Body Kenyon Cells Are Mediated by  $\alpha$ -Bungarotoxin-Sensitive Nicotinic Acetylcholine Receptors and Picrotoxin-Sensitive GABA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, *23*(27), 9246 LP-9253.
- Sudhakaran, I. P., Holohan, E. E., Osman, S., Rodrigues, V., VijayRaghavan, K., & Ramaswami, M. (2012). Plasticity of Recurrent Inhibition in the *Drosophila* Antennal Lobe. *The Journal of Neuroscience*, *32*(21), 7225 LP-7231.

- Tsai, K.-T., Hu, C.-K., Li, K.-W., Hwang, W.-L., & Chou, Y.-H. (2018). Circuit variability interacts with excitatory-inhibitory diversity of interneurons to regulate network encoding capacity. *Scientific Reports*. Institute of Cellular and Organismic Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan.
- Ueno, K., Naganos, S., Hirano, Y., Horiuchi, J., & Saitoe, M. (2013). Long-term enhancement of synaptic transmission between antennal lobe and mushroom body in cultured *Drosophila* brain. *The Journal of Physiology*, *591*(1), 287–302.
- Van Swinderen, B., & Andretic, R. (2011). Dopamine in *Drosophila*: setting arousal thresholds in a miniature brain. *Proceedings. Biological Sciences*, *278*(1707), 906–913.
- Venken, K. J. T., Sarrion-Perdigones, A., Vandeventer, P. J., Abel, N. S., Christiansen, A. E., & Hoffman, K. L. (2016). Genome engineering: *Drosophila melanogaster* and beyond. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, *5*(2), 233–267.
- Vosshall, L. B. (2000). Olfaction in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, *10*(4), 498–503.
- Vosshall, L. B., Amrein, H., Morozov, P. S., Rzhetsky, A., & Axel, R. (1999). A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, *96*(5), 725–736.
- Vosshall, L. B., & Stocker, R. F. (2007). Molecular Architecture of Smell and Taste in *Drosophila*. *Annual Review of Neuroscience*, *30*(1), 505–533.
- Waddell, S. (2013). Reinforcement signalling in *Drosophila*; dopamine does it all after all. *Current Opinion in Neurobiology*, *23*(3), 324–329.
- Walkinshaw, E., Gai, Y., Farkas, C., Richter, D., Nicholas, E., Keleman, K., & Davis, R. L. (2015). Identification of genes that promote or inhibit olfactory memory formation in *Drosophila*. *Genetics*, *199*(4), 1173–1182.
- Wu, C. L., Shih, M. F. M., Lee, P. T., & Chiang, A. S. (2013). An octopamine-mushroom body circuit modulates the formation of anesthesia-resistant memory in *Drosophila*. *Current Biology*, *23*(23), 2346–2354.
- Xia, R.-Y., Li, M.-Q., Wu, Y.-S., Qi, Y.-X., Ye, G.-Y., & Huang, J. (2016). A new family of insect muscarinic acetylcholine receptors. *Insect Molecular Biology*, *25*(4), 362–369.
- Yamamoto, D., Sato, K., & Koganezawa, M. (2014). Neuroethology of male courtship in *Drosophila*: from the gene to behavior. *Journal of Comparative Physiology A*, *200*(4), 251–264.

- Yasuyama, K., Meinertzhagen, I. A., & Schürmann, F.-W. (2002). Synaptic organization of the mushroom body calyx in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology*, *445*(3), 211–226.
- Zars, T. (2000). Behavioral functions of the insect mushroom bodies. *Current Opinion in Neurobiology*, *10*(6), 790–795.
- Zhang, J., Schulze, K. L., Hiesinger, P. R., Suyama, K., Wang, S., Fish, M., Scott, M. P. (2007). Thirty-one flavors of *Drosophila* rab proteins. *Genetics*, *176*(2), 1307–1322.