

## ARTICULOS ORIGINALES

### La regulación de un canal de K<sup>+</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> tipo BK es la razón fundamental de la tolerancia de solventes orgánicos y etanol en el modelo de la *Drosophila*.

Nigel Atkinson, Alfredo Ghezzi y Yan Wang  
Sección de Neurobiología, La Universidad de Texas, Austin, Texas, Estados Unidos

#### Resumen

El gen *slo* codifica un canal de K<sup>+</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> tipo BK. Este gen es muy similar entre las moscas y los mamíferos. Este gen desempeña un papel importante en la producción de tolerancia a los efectos de etanol y solventes orgánicos.

**Palabras Clave:** *Drosophila*, etanol, solventes orgánicos, tolerancia

(Recibido 6 Oct 2006; Aceptado 9 Nov 2006)

#### Introducción

En este reporte informamos sobre nuestros estudios acerca de los mecanismos de adicción. Usamos el organismo modelo *Drosophila melanogaster* también llamado la mosca de la fruta. ¿Por qué usamos *Drosophila* como un modelo? *Drosophila* tiene muchas ventajas. Ellos tienen un sistema nervioso mucho más simple que los mamíferos. A pesar de esto, ellos todavía muestran un comportamiento complejo. Tienen la habilidad de mostrar aprendizaje y memoria, ellos cortejan al sexo opuesto y se pelean por parejas y recursos (1-4).

Al nivel molecular, las moscas y los humanos tienen un sistema nervioso muy parecidos. La ventaja más grande de las moscas sobre los otros modelos es que la manipulación genética de moscas es excepcional. Las moscas y los humanos reaccionan de manera parecida a las drogas (5,6). Como en los humanos, con algunas dosis,

*Drosophila* muestra un aumento en la actividad. Las dosis más grandes causan la sedación. También como en los humanos, la *Drosophila* puede manifestar tolerancia a las drogas. La tolerancia puede resultar de un cambio en el metabolismo o una disminución en la reacción a la droga.

Nuestro laboratorio está interesado en el mecanismo molecular que produce la tolerancia a las drogas. Nos enfocamos en el mecanismo del sistema nervioso que produce tolerancia al etanol y los solventes orgánicos. Los solventes orgánicos son un tipo de anestésico. También, los solventes orgánicos son drogas de abuso en muchas comunidades.

#### Estudios moleculares sobre la tolerancia a drogas

La definición de tolerancia es la reducción de sensibilidad a la droga producida por previa exposición a la droga. Nos interesa la siguiente pregunta. ¿Cuál es el mecanismo molecular que causa la tolerancia a estas drogas? Hemos reportado que la sedación con etanol o solventes orgánicos causan la inducción de la expresión de un gen llamado *slo*, y esta inducción produce tolerancia a la sedación con estos solventes. En la mayoría de los casos, el etanol y otros solventes tienen los mismos efectos.

En nuestras publicaciones (5,7-9) hemos mostrado que la sedación induce una expresión neural del gen *slo*. Mutantes que eliminan la expresión del gen *slo* no desarrollan tolerancia en nuestro ensayo, mientras que la inducción transgénica del gen *slo* simula tolerancia.

La sedación induce la expresión del gen *slo*. ¿Pero qué codifica el gen *slo*? El gen *slo* codifica un canal de K<sup>+</sup> activado por Ca<sup>2+</sup>, tipo BK (10). Estos canales existen en todas partes del sistema nervioso. También se encuentran al lado de canales de calcio en las sinapsis y también se encuentran en músculos y epitelio.

¿Cómo medimos tolerancia en moscas? Comparamos el tiempo necesario para la recuperación después de la primera exposición a

la droga (etanol o alcohol bencílico) y el tiempo de recuperación después de la segunda exposición. La recuperación es más rápida después de la segunda exposición porque los animales adquieren tolerancia. No hay diferencia obvia entre el metabolismo de alcohol en ningún caso.

En un experimento típico, dividimos una población de moscas hembras en dos grupos. Estas moscas son de las mismas botellas y tienen la misma edad. Básicamente, las moscas de los dos grupos son iguales. El primer día, uno de los grupos recibe la droga (etanol o alcohol bencílico) en forma de vapor llevado por una corriente de aire. El aire está saturado con el solvente. El solvente puede ser etanol u otro solvente como alcohol bencílico. La dosis es suficiente como para sedarlos en aproximadamente quince minutos. El otro grupo recibe sólo aire (Fig.1).

El segundo día, ambas poblaciones reciben la misma dosis de la droga y registramos el tiempo que necesitan para recuperarse de la sedación. La tolerancia causa que este grupo se recupere más rápido que el otro grupo.

En la figura 2, el tubo de la izquierda contiene moscas que recibieron sólo aire el día anterior. El tubo de la derecha contiene moscas que fueron sedadas el día anterior. Ambas poblaciones recibieron alcohol bencílico. Vemos que las dos poblaciones se sedan muy rápido y es muy difícil notar diferencia entre los dos tubos. Cuando toda la población está sedada sacamos la fuente del solvente. Vigilamos las moscas durante el período de recuperación. Es obvio que la población que recibió la alcohol bencílico el día anterior se recupera y se levanta más rápido. En nuestro ensayo, solamente medimos el tiempo para recuperarse.

Figura 3A muestra solamente el período de recuperación de las dos poblaciones. La línea gris representa una población que se recupera de su primera sedación. La negra representa una población que se recupera de su segunda sedación. Noten que la población que se recupera de la segunda sedación, se levanta más rápido que la otra población. En las moscas, se puede medir

fiablemente este tipo de tolerancia. Y estas moscas tienen más ARN mensajero del gen *slo* que el grupo control.

Figura 3B muestra que mutantes en *slo* que previene expresión específicamente de *slo* en neuronas, destruyen la habilidad de adquirir tolerancia. Finalmente, figura 3C muestra que la expresión de *slo* de un transgen simula la tolerancia.

La región de promotores de transcripción del gen *slo* es muy complejo (Figura 4). El gen *slo* tiene cinco promotores. Uno es específico para los músculos y las células traqueales. Otros dos son específicos para las células epiteliales. Finalmente, dos son específicos para el sistema nervioso. La sedación con solventes orgánicos induce la expresión únicamente en el sistema nervioso.

Queremos contestar la pregunta: ¿Cómo la sedación activa la transcripción de *slo*? Comúnmente, las células usan la remodelación de la cromatina durante la activación de los genes (Figura 5). Un tipo de remodelación es la acetilación de la cromatina. La cromatina está hecha de ADN, histonas y otras proteínas. Medimos el estado de la acetilación de la cromatina con la prueba de inmunoprecipitación de cromatina. Mostramos que la sedación causa un cambio en el estado de acetilación de la cromatina en la región de control de transcripción del gen *slo*. La acetilación hace al ADN más accesible y este cambio apoya un aumento de transcripción. Después de la sedación, hay un aumento en la acetilación de la región a lado de los promotores neuronal y también la expresión de *slo* aumenta y también se puede registrar tolerancia (9).

Queremos saber si la acetilación está conectada con la adquisición de tolerancia. El butirato de sodio es un fármaco que suprime la enzima histona de-acetilasa y estimula la acetilación. Cuando las moscas comen comida con butirato de sodio, vemos un aumento en la acetilación de la región de control de *slo* y un aumento de la expresión de *slo*. El consumo del butirato de sodio simula comportamiento de tolerancia (9).

Los mutantes que eliminan la expresión de *slo* también bloquean la adquisición de tolerancia real contra la sedación de etanol o alcohol bencílico. Esto indica que *slo* es necesario para simular tolerancia con este químico. Mostramos que estas mutaciones también eliminan la habilidad del butirato de sodio de simular la tolerancia.

Otra pregunta que se ha hecho es: ¿Cómo afecta el aumento de *slo* las señales neuronales? Para contestar esta pregunta, usamos la preparación electrofisiológica llamada "la vía de la fibra gigante" (Fig.6). Hacemos un informe de estos resultados en Wang et al (9). Estimulamos el cerebro y directamente activamos las neuronas de la fibra gigante, esta neurona activa una inter-neurona, y la inter-neurona activa una moto-neurona. Para registrar la actividad de este circuito, usamos un electrodo en el músculo de vuelo.

En algunas preparaciones, se ha mostrado que *slo* afecta la habilidad de las neuronas de tener actividad repetitiva. Entonces aplicamos trenes de estimulación y notamos la frecuencia de los fracasos. Medimos la habilidad del circuito de responder a los trenes de estímulos. La fibra gigante de los animales que expresan más *slo* tiene más habilidad de responder más rápido. Pero un mutante que elimina expresión de *slo* en el sistema nervioso también elimina esta propiedad del sistema nervioso. La inducción del gen *slo* produce el comportamiento de tolerancia. La inducción de este gen también aumenta la habilidad de la vía de la fibra gigante de hacer la actividad repetitiva.

Nuestros estudios con el gen *slo* muestra que la sedación cambia el estado de la acetilación de la región de control del gen *slo*. La sedación induce la expresión del gen *slo*. El aumento de la expresión ayuda al sistema nervioso a que desarrolle tolerancia. El aumento de la expresión del gen *slo* incrementa la habilidad de hacer la actividad repetitiva quizás por medio de la reducción del período refractario de la neurona. Creemos que de esta manera estos cambios

contribuyen al comportamiento de la tolerancia.

#### **Agradecimientos.**

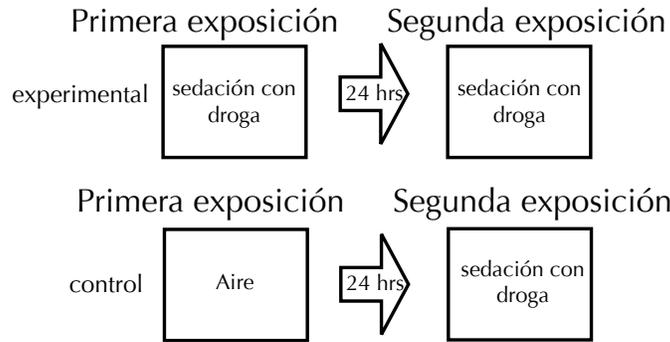
Le agradecemos a René Vacchio por corregir las pruebas este informe. NSF y NIH apoyan estas investigaciones.

#### **Referencias Bibliográficas**

1. Quinn, W. G., Harris, W. A. & Benzer, S. Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A 1974; 71: 708-712.
2. Hall, J. C. The mating of a fly. Science 1994; 264: 1702-1714.
3. Hendricks, J. C. et al. Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. Neuron 2000; 25: 129-138.
4. Chen, S., Lee, A. Y., Bowens, N. M., Huber, R. & Kravitz, E. A. Fighting fruit flies: a model system for the study of aggression. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 5664-5668.
5. Cowmeadow, R. B., Krishnan, H. R. & Atkinson, N. S. The slowpoke gene underlies rapid ethanol tolerance in *Drosophila*. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 2005; 29: 1777-1786.
6. Moore, L. A., Broihier, H. T., Van, D. M. & Lehmann, R. Gonadal mesoderm and fat body initially follow a common developmental path in *Drosophila*. Development 1998; 125: 837-844.
7. Ghezzi, A., Al-Hasan, Y. M., Larios, L. E., Bohm, R. A. & Atkinson, N. S. *slo* K+ channel gene regulation mediates rapid drug tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 17276-17281.
8. Cowmeadow, R. B. et al. Ethanol Tolerance Caused by slowpoke Induction in *Drosophila*. Alcohol Clin Exp Res 2006; 30: 745-753.
9. Wang, Y., Ghezzi, A., Krishnan, H. & Atkinson, N. S. Sedation-induced chromatin remodeling produces drug tolerance. 2006;
10. Atkinson, N. S., Robertson, G. A. & Ganetzky, B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus. Science 1991; 253: 551-555.

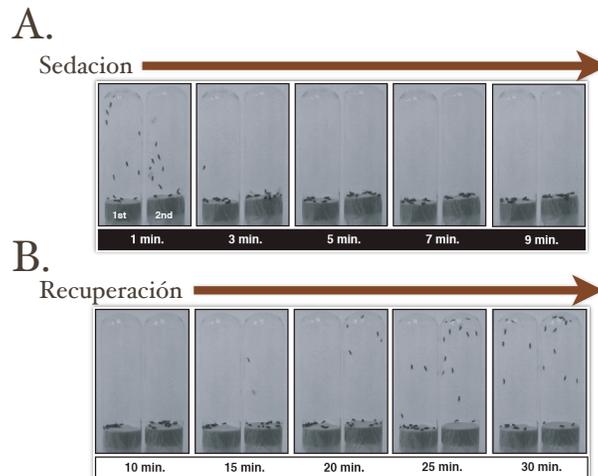
**Figura 1.**

El ensayo de tolerancia al etanol u otro solvente orgánico. En el primer día el grupo experimental recibe la droga. Les damos la droga en forma de vapor. Al segundo día ambos grupos recibe la droga y medimos el tiempo que requieren para reponerse.



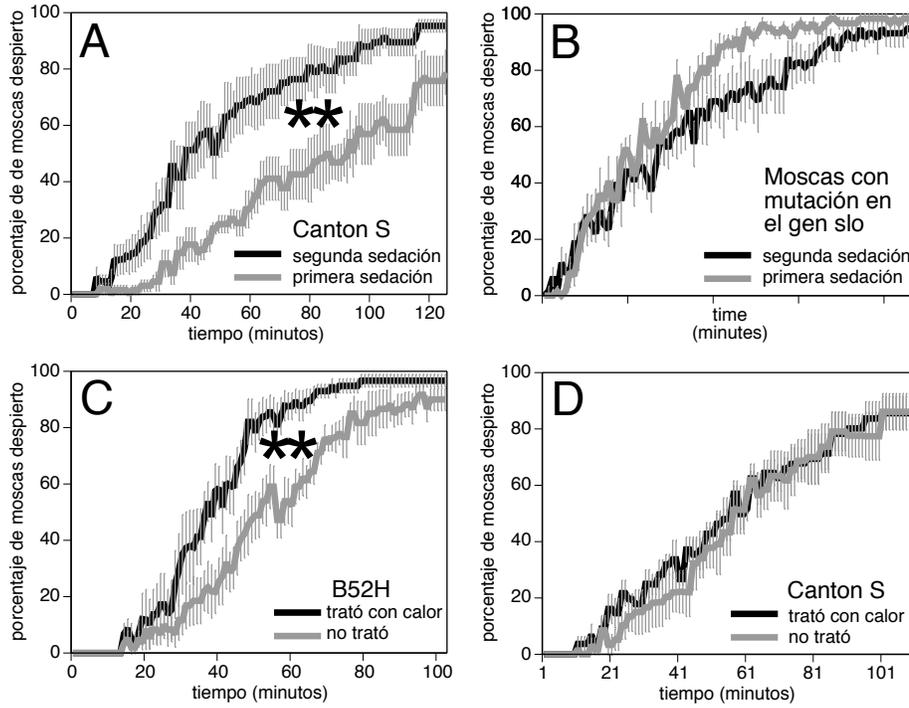
**Figura 2.**

Un ejemplo de tolerancia producida por el alcohol bencilico. A) Las moscas que recibieron la primera dosis y la segunda dosis se sedaron a la vez. B) Pero, las moscas que recibieron la segunda dosis se recuperaron mas rápido.



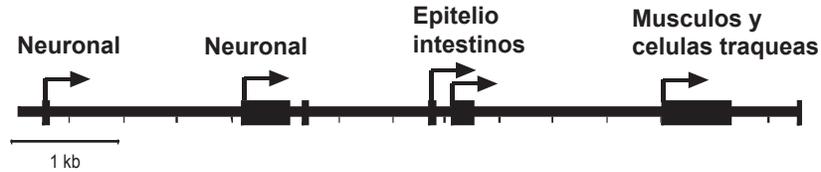
**Figura 3.**

La recuperación de poblaciones de la sedación. A) Canton S es una variedad salvaje. B) Los animales que padecen de mutantes en *slo* no muestran tolerancia. C) B52 es una variedad transgénico. En vez de sedarlos, activamos con calor un transgen que expresa *slo*. Esa expresión de *slo* imita la tolerancia. D) Cuando se expone la variedad Canton S al calor, no imita la tolerancia. Data de Cowmeadow et al. (8). \*\* significa que la diferencia es significativa.



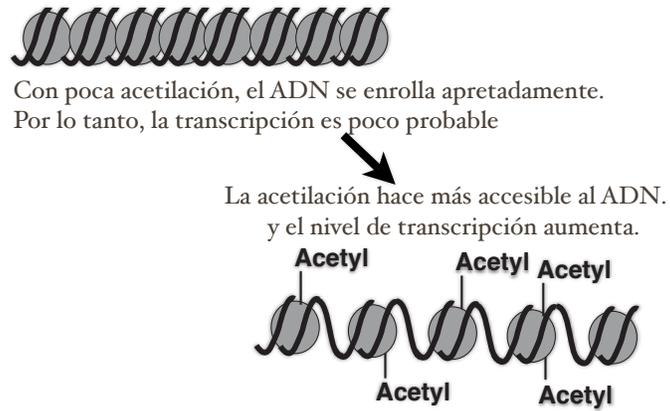
**Figura 4.**

La región de promotores del gen *slo*.



**Figura 5.**

La acetilación de histonas hace mas accesible al ADN.



**Figura 6.**

La vía de la fibra gigante y potenciales de acción.

