

Aldehído Deshidrogenasa Humana en una muestra de la población costarricense

Inés Santisteban

Instituto de Investigaciones en Salud, Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica.
Dirección actual: Dept. of Biochemistry, Medical College of St. Bartholomew's Hospital, Charterhouse Square
London EC 1M 6 BQ U.K.

Félix Baudrit Gómez

Departamento de Medicina Legal, Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica.

(Rec. 22-I-1988, Acep. 22-XI-1988)

Abstract: This is an electrophoretic study of ALDH isozymes in post-mortem tissue extracts. Three different electrophoretic variants of the isozyme ALDH₃ were found in the 100 individuals examined. One liver sample showed lack of ALDH₁ activity, but it remains unknown whether this is due to genetic mechanisms. The other two isozymes –ALDH₂ and ALDH₄– did not show any variations.

Alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH) catalizan las reacciones enzimáticas iniciales del metabolismo del etanol. Ambas enzimas presentan complejas características bioquímicas y determinación genética. Cinco loci autosómicos participan en la determinación genética de las isoenzimas de la ADH humana, las cuales se agrupan en 3 clases principales definidas por sus características bioquímicas (Smith 1986). Estudios de la aldehído deshidrogenasa señalan la existencia de al menos 4 formas moleculares determinadas por 4 loci diferentes (Harada *et al.* 1980). El cuadro 1 resume las principales características y distribución tisular preferencial de las isoenzimas. La mayor afinidad hacia determinados sustratos facilita la identificación de las isoenzimas luego de la separación electroforética. En el hombre los genes que codifican las isoenzimas ALDH₁ y ALDH₂ han sido asignados a los cromosomas 9 y 12 respectivamente (Hsu *et al.* 1985) y el locus ALDH 3 al cromosoma 17 (Santisteban *et al.* 1985).

Variantes ocasionadas por multiplicidad alélica en un mismo locus han sido reportadas

para casi todas las isoenzimas. Así, el alelo ALDH₂ origina una proteína carente de la actividad enzimática que normalmente exhibe la isoenzima ALDH₂ determinada por el alelo ALDH₂¹. Esta actividad deficiente se ha asociado con intolerancia al alcohol, postulándose una función protectora contra el alcoholismo ya que los individuos afectados prefieren abstenerse de ingerirlo (Harada *et al.* 1982). Ninguna otra variante de la ALDH hasta ahora se ha encontrado asociada con trastornos fisiológicos reconocidos.

La falta de expresión enzimática o gran variabilidad de la misma en tejidos y células de fácil acceso hace que el análisis *in vitro* deba realizarse con tejidos *post mortem*. Para este estudio los tejidos fueron obtenidos a través del Departamento Médico Forense del Organismo de Investigaciones Judiciales, con la colaboración del personal del Departamento de Medicina Legal de la Universidad de Costa Rica. La población analizada comprendió mujeres y hombres (N = 100) en su mayoría adultos, de las 7 provincias de Costa Rica, todos caucásicos de origen latino.

CUADRO 1

Propiedades de las isoenzimas de la ALDH humana

Isoenzima	Sustratos preferidos	Coenzima		Distribución Tisular	Estabilidad térmica
		NAD	NADP		
ALDH1	ald. alif./ aromáticos	+	+	heterogénea	alta
ALDH2	aldehídos alifáticos	+	—	hígado, riñón corazón	moderada
ALDH3	aldehídos aromáticos	+	+	estómago pulmón	baja
ALDH4	propion-aldehído	+	—	hígado, riñón	baja

Las muestras de tejidos se mantuvieron a 4°C por un período no mayor de 24 horas y posteriormente a -40°C hasta su análisis. Los extractos de tejido se prepararon en un volumen igual de Tritón-X-100 (0.1% en agua) utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem y centrifugación a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C. La separación de las isoenzimas se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de almidón (11%, Electrostar) en buffer TEMK pH 7.4 (5mM Tris, 0.5mM EDTA, 5 mM anhídrido maleico, 0.5mM KCl para el gel: 15 veces más concentrado para el puente). Los geles contenían 50 mg de NAD en un volumen final de 330 ml, lo mismo que el buffer puente en el extremo catódico. La electroforesis se realizó a 4°C por 18 horas a 5 voltios/cm. La actividad de ALDH se puso de manifiesto, en capa de agar sobrepuesta, utilizando benzaldehído o propionaldehído como sustrato (0.12 M), NAD (3 mM), MTT (metil tetrazolio) y PMS (fenazín metosulfato). El MTT origina un formazán púrpura por la acción reductora del NADH generado en la oxidación del sustrato.

El patrón electroforético típico para extractos de tejidos hepático y estomacal se ilustra en la figura 1a. Mientras que en hígado se expresan las isoenzimas ALDH1, ALDH2 y ALDH4, en estómago se presenta un predominio de ALDH3, y en menor grado ALDH1.

Semejante a lo informado en europeos y caucásicos en general (Hopkinson *et al.* 1985) no se encontraron variantes a nivel de ALDH2. Una sola muestra hepática presentó ausencia de la banda menos anódica de las 2 correspondientes a la isoenzima ALDH1 (fig. 1b). Sin em-

bargo, son necesarios más análisis para poder hacer consideraciones respecto a la naturaleza del defecto molecular que origina este fenotipo. Factores no-genéticos, i.e. degeneración hepática por alcoholismo, pueden ocasionar reducción en la actividad de la ALDH1. La isoenzima ALDH4 no mostró variación en la muestra estudiada.

Por el contrario, se encontraron 3 variantes diferentes de la isoenzima ALDH3. Al igual que el tipo usual de ALDH3 estas variantes se caracterizan por una mayor afinidad hacia aldehídos aromáticos (benzaldehído) y una expresión preponderante en tejido estomacal. La variante de migración electroforética más anódica exhibe 3 bandas cuya actividad enzimática sigue el patrón 1:2:1 propio del heterocigoto para enzimas dimericas. La banda más lenta es co-migrante con la banda única del tipo usual (fig. 1c). La frecuencia de esta variante fue 2% en la muestra estudiada.

Tres muestras de tejido estomacal presentaron variantes de ALDH3 de migración electroforética menos anódica (más lenta) que el tipo usual. En 2 de ellas la tinción enzimática revela actividad a nivel de 3 bandas, sin embargo, el gradiente de actividad en dirección al ánodo es 2: 1: 0.5 y las bandas más rápidas tienden a disminuir en intensidad al pre-incubar con 2 mercaptoetanol. Esto hace suponer que estas variantes se encuentran en estado homocigoto y que las bandas más débiles son de origen secundario (fig. 1c). La frecuencia de esta variante lenta fue 2%. La otra variante (1%) exhibió un claro patrón heterocigoto, híbrido de una variante lenta (distinta de las anteriores) y el tipo usual, tanto en tejido estomacal como

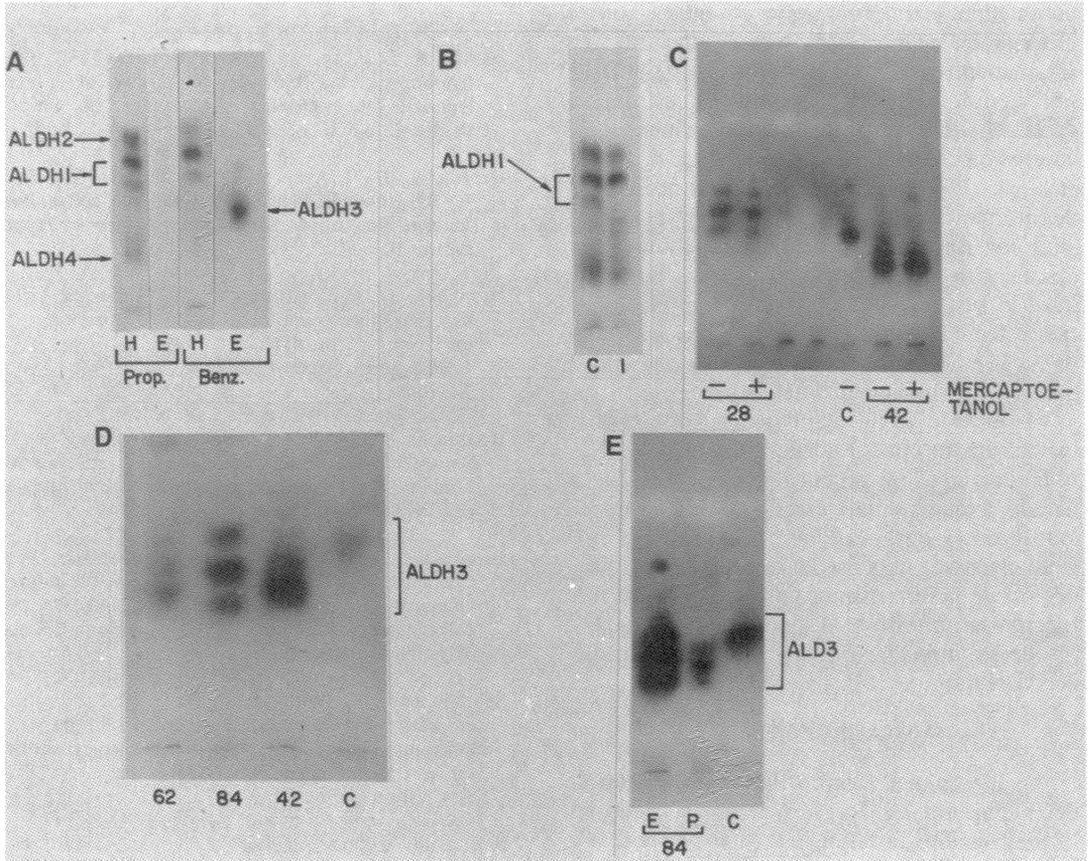


FIG. 1a. Patrones electroforéticos típicos de extractos de tejido hepático y estomacal utilizando propionaldehído y benzaldehído como sustrato. H = hígado, E = estómago. 1b. Electroforesis en gel de almidón de extracto hepático (1) con ausencia de actividad ALDH1. C = control. Sustrato: propionaldehído. 1c. Variantes electroforéticas de ALDH3 en extractos de tejido estomacal antes y después de tratamiento con 2-mercaptoetanol. 28 = variante rápida, 42 = variante lenta, c = control. Sustrato: benzaldehído. 1d. Variantes lentas de ALDH3. Los extractos estomacales 62 y 42 muestran migración electroforética semejante, compatible con un patrón homocigota. El espécimen 84 exhibe un fenotipo heterocigota donde la banda menos anódica presenta movilidad distinta de la banda principal en 62 y 42. C = control (estómago). Sustrato: benzaldehído. 1e. Variante lenta heterocigota en el locus ALDH3 demostrada en extractos estomacal y pulmonar del mismo individuo mediante electroforesis en gel de almidón. E = estómago, P = pulmón, C = control (estómago). Sustrato: benzaldehído.

pulmonar. Las 2 bandas externas representan moléculas homodiméricas y la central corresponde al heterodímero característico de un individuo heterocigoto en el locus ALDH3 (figs. 1d y 1e). Este hallazgo constituye evidencia fresca sobre la estructura dimérica de esta isoenzima.

En contraposición con los loci de las otras isoenzimas de la ALDH, el locus de la ALDH3 aparenta ser más variable. En total, 5% de la muestra mostró variación a nivel de ese locus. En individuos norte-europeos se ha mencionado un 4% de variación (Hopkinson *et al.* 1985)

y en chinos e hindúes 5.6% y 3% respectivamente (Teng 1981).

Un mínimo de 4 alelos diferentes son responsables de la determinación genética de los fenotipos variantes y usual de ALDH3 en el presente estudio. El porqué de esta mayor variabilidad relativa a los otros loci no está claro pues la función específica in vivo de la isoenzima ALDH3 aún se desconoce. Asumiendo que ALDH1 y ALDH2 son más importantes fisiológicamente, es posible pensar que sea ésta una explicación a favor de su relativa mayor estabilidad genética. Otro argumento es

el de tipo estructural, que se enlaza con el anterior en cuanto estructura y función están íntimamente relacionadas. ALDH1 y ALDH2 son homotetrámeros y aunque la estructura de la ALDH3 es más debatida, la evidencia favorece una estructura homodimérica. Harris *et al.* (1977) han observado que la ocurrencia de polimorfismos enzimáticos sigue una relación inversa con el número de subunidades, lo cual parece deberse a una menor susceptibilidad a sustituciones en aquellos aminoácidos que están involucrados en contactos inter-unidades y en el mantenimiento de la estabilidad molecular y función enzimática.

Finalmente es necesario señalar que el análisis electroforético evidencia una fracción de toda la variación genética posible por locus debido a que es más efectivo para reconocer sustituciones que ocasionan cambios en la carga molecular. Así, es de esperar el descubrimiento de polimorfismos en fragmentos de restricción tan pronto se disponga de las "sondas" (probes) apropiadas que permitan el escrutinio del ADN mismo.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Ramiro Barrantes la revisión del manuscrito, a Jorge Azofeifa la ayuda en la preparación de las figuras y al personal administrativo del Departamento de Patología del Organismo de Investigaciones Judiciales la colaboración en la recolección de las muestras. Este trabajo fue parcialmente financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica mediante el proyecto No. 111-79-005. El Departamento de Bioquímica de la Escuela de Medicina (UCR) generosamente proporcionó parte de los reactivos.

REFERENCIAS

- Harada, S., D. P. Agarwal & H. W. Goedde. 1980. Electrophoretic and biochemical studies of human aldehyde dehydrogenase isozymes in various tissues. *Life Sci.* 26: 1773-1780.
- Harada, S., D. P. Agarwal, H. W. Goedde, S. Tagaki & B. Ishikawa. 1982. Possible protective role against alcoholism for ALDH isozyme in Japan. *Lancet* II: 827.
- Harris, H., D. A. Hopkinson & Y. H. Edwards. 1977. Polymorphisms and the subunit structure of enzymes: a contribution to the neutralist-selectionist controversy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 698-701.
- Hopkinson, D. A., I. Santisteban, S. Povey & M. Smith. 1985. Biochemical genetic analysis of human and rodent aldehyde dehydrogenase (ALDH). *Alcohol* 2: 73-78.
- Hsu, L. C., A. Yoshida & T. Mohandas. 1985. Chromosomal assignment of the genes for human aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) and aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2). 1985. *Human Gene Mapping 8*, Helsinki Conference.
- Santisteban, I., S. Povey, L. F. West, J. Parrington & D. A. Hopkinson. 1985. Chromosome assignment, biochemical and immunological studies on a human aldehyde dehydrogenase. ALDH3. *Ann. Hum. Genet.* 49: 87-100.
- Smith, M. 1986. Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenases, vol. 15, p. 249-299. In H. Harris & K. Hirschhorn (eds.). *Advances in Human Genetics*. Plenum Press, New York.
- Teng, Y. S. 1981. Stomach aldehyde dehydrogenase: report of a new locus. *Hum. Hered.* 31: 74-77.