

Metodologia para estudo do polimorfismo do gene da enzima álcool desidrogenase

André Soares Rebello¹

Maria da Glória da Costa Carvalho²

Resumo

As principais enzimas responsáveis pelo metabolismo do álcool são a álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). Essas enzimas estão presentes em várias formas e são codificadas por diferentes genes. Alguns desses genes apresentam polimorfismos, e as enzimas codificadas por eles podem apresentar diferenças quanto à eficiência metabólica em relação ao álcool e ao aldeído acético. Essa variação tem se mostrado um fator que influencia a quantidade de álcool ingerido e o risco no aumento de abuso e dependência ao álcool. Neste trabalho, nós descrevemos um método que permite estudar o polimorfismo de um dos genes da enzima álcool desidrogenase, o gene ADH1C. O DNA foi isolado de doadores e o polimorfismo foi determinado pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). Nossos resultados confirmam a viabilidade da técnica por nós descrita para o estudo do polimorfismo do gene ADH1C.

Palavras-chave. Alcool desidrogenase; polimorfismo; dependência alcoólica.

INTRODUÇÃO

A enzima álcool desidrogenase (ADH) cataliza a reação de oxidação do etanol na presença da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), que é reduzido à forma NADH, gerando, como consequência, uma molécula de acetaldeído. Esse, por sua vez, é oxidado na presença da enzima aldeído desidrogenase (ALDH), numa reação em que, novamente, NAD é reduzido a NADH, dando origem a uma molécula de ácido acético, conforme se apresenta na Figura 1 (RANG; DALE; RITTER, 1997).

O conjunto de enzimas chamadas de álcool desidrogenase (ADH) apresenta uma grande complexidade genética e funcional. Essas enzimas variam bastante em suas propriedades farmacocinéticas. As várias formas da enzima ADH são divididas em cinco classes distintas, de acordo com as subunidades, composição de suas isoenzimas e suas propriedades físico-químicas (OSIER et al., 2002; AGARWAL, 2001; DICK; FAROUD, 2003). Os genes para ADH estão localizados no cromossoma 4 e se dividem em grupos, conforme resumido no Qua-

¹Mestrando. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

²Professora Adjunta. Doutora. Laboratório do Controle da Expressão Gênica. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Correspondência para / Correspondence to:

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Centro de Ciências da Saúde. Bloco G. Avenida Carlos Chagas Filho, 373. Cidade Universitária

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

21941-902. Rio de Janeiro – Rio de Janeiro – Brasil

Tel.: (21) 2562-6721 / (21) 2562-6722. Fax.: (21) 2280-8193

E-mail: mgccosta@biof.ufrj.br

Classe	Gene	Alelo	Mudança de nucleotídeo	Efeito na proteína
I	ADH1 ADH2	ADH1A*1;		Forma selvagem
		ADH1B*1;		Forma selvagem
	ADH3	ADH1B*2;	47G>A	Arg>His
		ADH1B*3;	369C>T	Arg>Cis
		ADH1C*1;		Forma selvagem
		ADH1C*2;	349G>A	Ile>Val
II	ADH4	ADH4	-192; -159; -75	Atividade reduzida
III	ADH5	ADH5		Forma selvagem
IV	ADH7	ADH7		Forma selvagem
V	ADH6	ADH6		?*

Quadro 1- Classificação dos genes da Álcool Desidrogenase

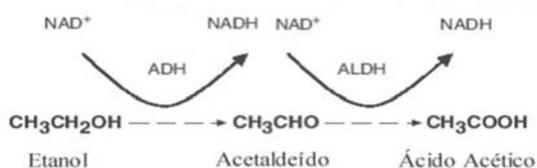


Figura 1- Esquema de oxidações sucessivas do etanol.

dro 1. Nesse Quadro, também são apresentados os alelos correspondentes e os tipos de polimorfismo mais estudados.

Apesar das fortes evidências de componentes genéticos associados ao alcoolismo, a detecção de polimorfismo em genes específicos envolvidos nessa relação tem dado resultados ainda insatisfatórios. Muitos são os genes candidatos, mas, devido à contribuição dos fatores ambientais na gênese desse distúrbio, tem sido difícil estabelecer, com segurança, que alelos participariam desse processo. Esses genes provavelmente interagem com os fatores ambientais, porque os experimentos genéticos sugerem que o meio ambiente tanto pode exacerbar quanto proteger a expressão genética de predisposição ao alcoolismo (DICK; FAROUD, 2003; DAVIS et al., 2002; MESSAS; VALLADA FILHO, 2004).

Até o momento, os únicos genes comprovadamente envolvidos com a susceptibilidade ou resistência ao alcoolismo têm sido aqueles relacionados ao metabolismo do etanol, mais especificamente, os genes codificadores da

álcool desidrogenase (ADH) e da aldeído desidrogenase (ALDH). Outros genes, entretanto, têm sido bastante estudados, tais como os genes para os receptores do ácido gama amino butírico (GABA), receptores de dopamina, transportadores de dopamina, neuropeptídeo Y (DICK; FAROUD, 2003; DAVIS et al., 2002; MESSAS; VALLADA FILHO, 2004).

Este trabalho tem como objetivo descrever uma metodologia que permite estudar o gene da enzima álcool desidrogenase (ADH). Tal estudo nos permitirá, futuramente, caracterizar a presença de polimorfismos da ADH na população brasileira e estabelecer uma possível correlação com o alcoolismo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

Trata-se de um estudo de genética molecular, em que todos os indivíduos convidados a participar foram informados através de termo de consentimento, livre e esclarecido, no qual foi explicado o objetivo da pesquisa, assim como o procedimento de coleta da amostra.

O desenvolvimento experimental deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Protocolo de Pesquisa nº 069/07 – CEP emitido em 16/06/2007.

Sítio polimórfico	Iniciadores direto e reverso	Condições de ciclagem	Enzima	Tamanho do fragmento (pb)	
				Sítio ausente	Sítio presente
ADH1C Ile 349Val	A3FXNFOR1 (5' -TTG TTT ATC TGT GAT TTT TTT TGT-3') A3FXNREV3 (5' -CGT TAC TGT AGA ATA CAA AGC -3')	95°C (15s), 51°C (15s), 72°C (75s)	SspI	378	274+1 04

Quadro 2- Processamento do DNA pela PCR

Coleta

Foi coletado escovado de células provenientes da mucosa oral através de fricção, durante 30 segundos, na parte interna da bochecha (superior e inferior), sempre girando a escova. O processo é repetido com uma segunda escova no outro lado da bochecha. Após a coleta, a escova é guardada em um tubo e transportada para o laboratório, à temperatura ambiente. Esse procedimento é indolor e sem risco para o indivíduo.

Extração do DNA

A escova com o material biológico é mergulhada em tubo eppendorf de 1,5 mL que contém 500 uL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA, 10 mM; NaCl 10 mM; SDS a 2 %) e 15 uL de proteinase K, 10mg/mL. Movimentos circulares são feitos para retirar o material da escova.

O material é incubado por 2 horas a 56 °C. São adicionados 500 uL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (1:1) e, logo em seguida, o tubo é agitado por cerca de 1 minuto, centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos, com posterior retirada da fase aquosa com "tip" de barreira que é transferida para outro tubo previamente marcado. Adicionam-se 15 uL de NaCl 5M e 1000 uL de etanol a 95% e mistura-se por inversão. Em seguida, o material é incubado a 20°C, no mínimo por 1

hora, com posterior centrifugação durante 20 min. a 8000rpm. O sobrenadante é retirado por sucção e secado.

Finalmente, o DNA é ressuspensionado em 26 uL de água e estocado a -20°C.

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O DNA foi processado através da PCR, conforme descrito no Quadro 2. A PCR é feita usando-se 2ml de DNA, 100ng de cada iniciador, dNTP 200 mM, MgCl₂ 2.0mM, KCl 50mM, Tris HCl 10mM (pH 8,4), e 0,5 U de "amplitaq DNA polimerase" em um volume total de 25ml.

Todos os protocolos de ciclagem são feitos conforme descrito na Tabela 2, com uma ciclagem inicial de 95°C, por 5 min, e uma final de 72°C, por 10 min

Os produtos da PCR são digeridos com 5U da enzima de restrição *SspI*, com o uso do tampão recomendado pelo fabricante *New England Corporation* (OSIER et al., 2002).

Análise do produto formado

A análise do produto formado foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. O gel foi obtido pela mistura de acrilamida-bisacrilamida (30:8) 3,32ml; tampão TBE 5x concentrado 2

ml; persulfato de amônio 10%, 240µl; TEMED 2,66µl e água destilada 4,44 ml.

O tampão TBE 5x concentrado contém Tris-base 60,5g, ácido bórico 30,85g, EDTA 3,72g, diluídos em água destilada para 1l.

O gel é corrido em cuba apropriada para eletroforese, com tampão TBE 1x concentrado. A voltagem utilizada foi de 80 volts.

Coloração pela prata

Em seguida o produto do gel é evidenciado com coloração pela prata, obedecendo-se às seguintes etapas:

1. Colocação do gel em solução fixadora, formada pela mistura de 5ml de etanol, 0,37 ml de ácido acético e água destilada para 50ml. O período de fixação é de 15 minutos, com agitação leve.

2. Retira-se a solução fixadora e cora-se pela prata. O gel é imerso em uma solução com 0,1g de nitrato de prata em água destilada para 50 mL de volume final e deixado durante 10 minutos com agitação leve.

3. Em seguida, o gel é lavado rapidamente com 50ml de água destilada e colocado em solução reveladora que contém 1,5g de NaOH, 0,4mg de formaldeído e água destilada para 50ml de volume final.

Após a coloração satisfatória das bandas, o gel é encubado em 50 ml de solução fixadora, por 10 minutos, seguindo-se documentação fotográfica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de verificar a viabilidade do método utilizado para obtenção do DNA através de escovado da mucosa oral, realizamos a coleta e extração de DNA de doadores voluntários, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Posteriormente, o DNA foi amplificado pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), utilizando-se o iniciador para a região do gene ADH1C (Ile349Val). Conforme mostra o resultado da Figura 2, os produtos de amplifica-

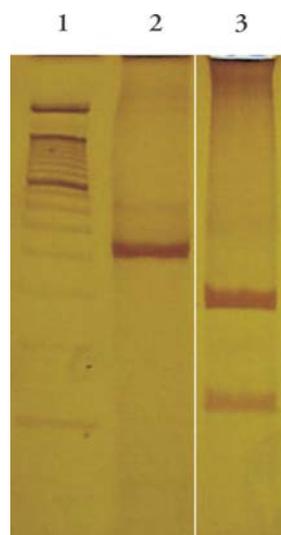


Figura 2 - Produto amplificado do gene ADH1C.

Nota: Canal 1- escala de pares de base 100pb; Canal 2- produto amplificado de 378 pb não sensível à ação da enzima *SspI*; Canal 3- produto amplificado sensível à *SspI* onde se notam os produtos de 274 e 104 pb

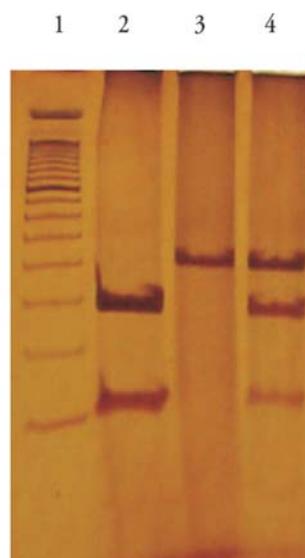


Figura 3 - Análise de indivíduos homocigóticos e heterocigóticos.

Nota: Canal 1- escala de pares de bases (100 pb); Canal 2 - DNA de indivíduo homocigoto, apresentando dois fragmentos de 104 e 278 pb, correspondendo ao tipo A/A ou Ile/Ile; Canal 3- DNA de indivíduo homocigótico, apresentando ausência de sítio de restrição para enzima *SspI*, o que corresponde ao genótipo G/G ou Val/Val; Canal 4- DNA de indivíduo heterocigótico sendo um alelo com ausência do sítio de restrição para enzima *SspI* com genótipo G e aminoácido na proteína Val, e o outro alelo com a presença do sítio de restrição com genótipo A e aminoácido Ile.

ção obtidos após tratamento com a enzima de restrição *SspI* são compatíveis com os esperados e descritos por Osier e colaboradores (2002). Observa-se, no canal 2, um produto amplificado de 378 pares de base (pb). Um produto com esse peso molecular indica que este gene não foi sensível ao tratamento com a enzima de restrição *SspI*. Já no canal 3, vemos o produto de amplificação do gene ADH1C apresentando 2 fragmentos, respectivamente de 104 e 278pb, demonstrando que esse alelo é sensível à enzima de restrição *SspI*.

Na Figura 3, ilustramos as diferenças entre os indivíduos homozigóticos e heterozigóticos. Para tanto, DNA de três voluntários diferentes foi extraído, amplificado por PCR e posteriormente tratados com enzima de restrição *SspI* e o produto submetido à análise em gel de poliacrilamida e corado pela prata, conforme foi descrito. No canal 2, vemos a presença de apenas 2 fragmentos de 104 e 278 pb, respectivamente. Tal dado indica que esse gene é sensível à enzima de restrição, como referido na Figura 2. Conclui-se, também, que o indivíduo é do tipo homozigótico, já que os dois alelos apresentaram o mesmo comportamento. No canal 3, temos outro exemplo de indivíduo homozigótico. Pode-se observar a presença de apenas 1 fragmento de 378 pb, o que indica não só que o gene desse indivíduo não é sensível à *SspI*, como também que os seus alelos se comportaram da mesma forma, demonstrando a homozigose. Já no canal 4, verificamos a presença de três bandas de peso molecular 104, 278 e 378 pb, respectivamente. Esse fato demonstra a heterozigose desse indivíduo, já que um alelo se mostrou sensível à enzima *SspI* (originando 2 fragmentos de 104 e 278 conforme descrito anteriormente) e o outro não sensível (um fragmento apenas de 378pb).

O gene que apresenta a ausência de sítio de restrição para a enzima *SspI* corresponde ao genótipo Guanina/Guanina (G/G), significando que vai formar uma proteína com a composição Val349Val (Val corresponde ao aminoácido valina) situada no exon 8. Essa é a

forma ancestral do gene. Esse genótipo, como descrito, indica predisposição ao alcoolismo. Já o DNA sensível à enzima de restrição corresponde ao tipo Adenina/Adenina (A/A), o que gera, na posição 349, o tipo portador de Isoleucina, ou seja, Ile349Ile, o que sugere proteção ao alcoolismo pelos dados da literatura. O genótipo tipo A/A, que produz a enzima Ile349Ile, corresponde à enzima de alta atividade (OSIER et al., 2002; XINGGUANG et al., 2006; CONNIE et al., 2003). O tipo heterozigótico, obviamente, apresenta o genótipo A/G, que gera a enzima do tipo Ile 349Val.

Esses resultados nos possibilitam dizer que nossa técnica se mostrou eficiente para a análise do gene ADH1C e seu polimorfismo, podendo, dessa forma, ser empregada com sucesso na análise da composição genotípica de uma dada população, além de se poder avaliar se há relação entre os genótipos e a presença ou não de predisposição ao alcoolismo nessa mesma população. Conforme foi dito anteriormente, o tipo G/G é indicador de que o indivíduo é predisposto ao alcoolismo, e o tipo A/A é protegido. Claro está que essas conclusões não são tão simples, já que, como foi enfatizado na Introdução, trata-se de uma doença complexa, que envolve tanto a participação de outros genes bem como fatores ambientais. Como foi dito, o método também permite caracterizar o genótipo de uma dada população brasileira quanto ao gene ADH1C, dado esse que, segundo nos consta, não foi ainda levantado. O estudo da população brasileira é de grande importância, devido, principalmente, à sua enorme miscigenação. Podemos acrescentar também que, atualmente, a esperança da medicina no emprego da farmacogenômica é muito grande, pois sabemos que os alelos apresentam polimorfismos com distribuição variada em diferentes populações, o que influencia a resposta a medicamentos (LICINIO, 2001). Conhecer, portanto, o genótipo de um indivíduo permite que ele possa, no futuro, receber a conduta terapêutica mais adequada.

Methodology to study the polymorphism of alcohol dehydrogenase gene

Abstract

The main enzymes responsible for the metabolism of ethanol are alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH). These enzymes are present in many forms and are encoded by different genes. Some of these genes are polymorphic and the enzymes encoded by these genes may present different metabolic efficiency towards alcohol and acetic aldehyde. These variations has been shown to influence the quantity of alcohol intake and in the higher risk of alcohol abuse and dependence. In this work we describe a method that allows to study the polymorphism of one of the genes for the alcohol dehydrogenase enzyme, the gene ADH1C. The DNA was isolated from volunteers and the polymorphism of the ADH1C gene was determined by polymerase chain reaction (PCR). Our results confirm the feasibility of the technique described by us to study the polymorphism of the ADH1C gene.

Keywords: Alcohol dehydrogenase- Genetic polymorphism- Alcohol dependence.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, D.P. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol. Biol.*, Paris, v.49, p.703-709, 2001.
- CONNIE, J.et al. Allelic variation at alcohol metabolism genes (ADH1B, ADH1C, ALDH2) and alcohol dependence in an American Indian population. *Human Genetic.*, Berlin, v.113, p.325-336, 2003.
- DAVIS, K.L. et al. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress.* Hagerstown : Lippincott, Williams & Wilkins, 2002.
- DICK, D.M. et al. Exploring gene-environment interactions: socioregional moderation of alcohol use. *J. Abnorm. Psychol.*, Washington, DC, v.110, p.625-632, 2001.
- DICK, D.M.; FAROUD, T. Candidate genes for alcohol dependence: a review of genetic evidence from human studies. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, Oxford, v.27, p.868-879, 2003.
- LICINIO, J. Farmacogenômica: oportunidade e desafios. *R. Bras. Psiquiatr.*, São Paulo, v.23, n.3, p.122-123, 2001.
- MESSAS, G.P.; VALLADA FILHO, H.P. O papel da genética na dependência do álcool. *R. Bras. Psiquiatr.*, São Paulo, v.26, p.54-58, 2004. Suplemento 1.
- OSIER, M.V. et al. A global perspective on genetic variations on the ADH genes reveals unusual patterns of linkage disequilibrium and diversity. *Am. J. Hum. Genet.*, Chicago, v.71, p.84-99, 2002.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia* 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- XINGGUANG, L. et al. Diplotype trend regression analysis of the ADH gene cluster and the ALDH2 gene: multiple significant associations with alcohol dependence. *Am. J. Hum. Genet.*, Chicago, v.78, p.973-987, 2006.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que financiou este trabalho.

Recebido em / Received: 29/05/2008
Aceito em / Accepted: 10/07/2008