


Associação entre polimorfismo do gene da interleucina-6 e regulação do ferro em pacientes em hemodiálise infectados pelo HCV

Association between interleukin-6 gene polymorphism and iron regulation in hemodialysis patients infected with HCV

Autores

Yasser B.M. Ali¹ 

Saad G. Moussa¹

Samar M. Shahen¹

Mohammed A. Dewir²

Ibrahim H. El-Sayed³

¹University of Sadat City, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute (GEBR), Molecular Biology Department, Sadat City, Egypt.

²Desouk General Hospital, Hemodialysis Unit, Kafr El-Sheikh, Egypt.

³Kafr El-Sheikh University, Faculty of Science, Biochemistry Department, Kafr El-Sheikh, Egypt.

Submetido em: 05/02/2020.

Aprovado em: 12/05/2020.

Correspondência para:

Yasser B.M. Ali

E-mail: yasser.ali@gabri.usc.edu.eg

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2019-0188>

RESUMO

Introdução: A hepcidina está associada à patogênese da anemia por insuficiência renal crônica, considerada um estado inflamatório crônico e também infecção por HCV. A IL-6 estimula a liberação de hepcidina a partir do fígado, suprime a captação intestinal de ferro e libera ferro das reservas internas.

Método: Para detectar a associação entre o polimorfismo do gene IL-6 e os marcadores de anemia, 80 pacientes em hemodiálise (HD) [40 pacientes em HD, negativos para HCV; e 40 em HD, positivos para HCV] foram avaliados por exames químicos de rotina e hemograma completo, além da avaliação da hepcidina sérica, parâmetros do ferro [ferro sérico e ferritina sérica] e marcadores de hepatite C. O polimorfismo da IL-6 -174G/C foi determinado por MS-PCR, enquanto os polimorfismos de IL-6 -597G/A e -572 G/C foram detectados por PCR-SSP. **Resultados:** A hepcidina não esteve significativamente elevada em pacientes com HCV em comparação com pacientes em hemodiálise negativos para HCV. Uma diferença estatisticamente significativa foi detectada entre os pacientes em HD HCV negativos comparados aos positivos nas frequências de IL-6 -174 G/C e -597 G/A ($P \leq 0,01$ e $P \leq 0,001$, respectivamente). Por outro lado, foi relatada uma diferença não significativa entre pacientes em HD HCV negativos e positivos nas frequências de IL-6 -572 G/C. **Conclusões:** Nosso estudo indicou que os polimorfismos de IL-6 -174 G/C e -597 G/A podem desempenhar um papel na suscetibilidade ao HCV em pacientes em HD. Ainda necessitamos de estudos prospectivos adicionais em uma população maior para confirmar nossos achados.

Descritores: Hecpidinas; Anemia; Diálise Renal; Hepacivirus; Polimorfismo Genético; Interleucina-6.

ABSTRACT

Backgrounds: Hecpidin is related to the pathogenesis of chronic renal failure anemia, which is considered a chronic inflammatory state as well as HCV infection. IL-6 stimulates the release of hepcidin from the liver, suppresses intestinal iron uptake, and releases iron from internal stores. **Method:** To detect the association between IL-6 gene polymorphism and anemia markers, 80 hemodialysis (HD) patients [40 negative HCV HD patients and 40 positive HCV HD patients] were studied by routine chemistry and complete blood count, in addition to the assessment of serum hepcidin, iron parameters [serum iron and serum ferritin], and hepatitis C markers. IL-6 polymorphism -174G/C was determined by MS-PCR, while IL-6 polymorphisms -597G/A and -572 G/C were detected by PCR-SSP. **Results:** Hecpidin was non-significantly elevated in HCV-positive compared with HCV-negative hemodialysis patients. A statistically significant difference was detected between the negative and positive HCV HD patients in frequencies of IL-6 -174 G/C and -597 G/A ($P \leq 0.01$ and $P \leq 0.001$, respectively). On the other hand, a non-significant difference was reported between negative and positive HCV HD patients in the frequencies of IL-6 -572 G/C. **Conclusions:** Our study indicated that IL-6 -174 G/C and -597 G/A polymorphisms may play a role in HCV susceptibility in HD patients. Additional prospective studies on a larger population are needed to confirm our findings.

Keywords: Hecpidins; Anemia; Renal Dialysis; Hepacivirus; Polymorphism, Genetic; Interleukin-6.



INTRODUÇÃO

A insuficiência renal crônica é uma deterioração lenta, insidiosa e irreversível da função renal¹. A prevalência mundial da doença é estimada entre 8 e 16%. A anemia é uma característica comum da doença renal crônica (DRC), associada a desfechos desfavoráveis. O manejo atual de pacientes com anemia na DRC é controverso, com recentes ensaios clínicos demonstrando aumento da morbimortalidade relacionada a agentes estimuladores da eritropoiese². Pacientes em diálise são frequentemente afetados por múltiplas comorbidades que podem contribuir direta ou indiretamente para a anemia. A natureza sistêmica e crônica dessas doenças causa frequentes eventos intercorrentes que podem diminuir os níveis de hemoglobina (Hb)³.

Nos pacientes em hemodiálise (HD), a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é a causa mais comum de hepatite aguda e crônica e aumenta o risco de óbito⁴. Nos países desenvolvidos, a prevalência de soropositividade ao anti-HCV entre pacientes em HD de manutenção varia entre 5 e 60%⁵. A frequência do HCV é muito maior em pacientes submetidos a diálise em países menos desenvolvidos. No Egito, a prevalência de anticorpos anti-HCV em pacientes em hemodiálise varia de 52,3 a 82,3%⁶. Pacientes com infecção crônica pelo HCV geralmente têm maior concentração de ferro no fígado. No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de acúmulo de ferro hepático⁷.

Acredita-se que a hepcidina, um hormônio peptídico de 25 aminoácidos, sintetizado exclusivamente no fígado, seja um regulador chave da homeostase do ferro. A hepcidina é induzida por infecção e inflamação⁸⁻¹⁰. A regulação prejudicada da hepcidina pode ter participação nas alterações do metabolismo do ferro em pacientes em HD com infecção pelo HCV⁷. Enquanto a inflamação e a concentração de ferro induzem a produção de hepcidina, a atividade eritropoiética suprime sua produção. No caso da inflamação, o mediador primário parece aumentar os níveis de interleucina-6 (IL-6), que por sua vez causa a ligação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) ao promotor da hepcidina, aumentando sua atividade^{8,11}. A IL-6, uma das citocinas pró-inflamatórias mais bem estudadas, é um importante mediador de resposta na fase aguda¹².

O número de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no genoma humano é estimado em cerca de um

milhão. Como os SNPs podem alterar a expressão e a função gênica, há um interesse considerável em sua variabilidade interindividual quanto à suscetibilidade e pré-disposição a doenças¹³. Em pacientes em HD, os polimorfismos genéticos que modulam a síntese de IL-6 podem representar um meio para testar a ligação entre IL-6 e o desenvolvimento de DRC¹⁴. No presente estudo, analisamos o polimorfismo do gene IL-6 em pacientes egípcios soropositivos crônicos para HCV em HD regular para avaliar a associação entre IL-6 e marcadores de anemia.

MATERIAIS E MÉTODOS

PACIENTES E CONTROLES

Este estudo foi realizado em 80 pacientes egípcios sem parentesco, em HD crônica regular por pelo menos um ano. Eles foram recrutados na unidade de hemodiálise do Hospital Geral de Desouk, Kafr El-Sheikh, Egito. Todas as investigações foram realizadas seguindo as diretrizes do Comitê de Apuramento Ético e de Saúde da Universidade da Cidade de Sadat para Pesquisas Clínicas. O comitê de ética local aprovou o protocolo do estudo e o consentimento informado foi obtido de todos os pacientes.

A infecção pelo HCV foi diagnosticada pela presença de anticorpos contra o HCV, usando o ensaio imunoenzimático (ELISA) e confirmada pela presença de RNA-HCV usando a PCR em tempo real. Para infecção por HBV, o antígeno de superfície do HBV (HBsAg) foi testado usando-se o teste ELISA. De acordo com a presença de infecção pelo HCV, os pacientes em hemodiálise foram divididos em dois grupos. O grupo (1) incluiu 40 pacientes em hemodiálise sem infecção pelo HCV. O grupo (2) incluiu 40 pacientes em hemodiálise com infecção pelo HCV. Ambos os grupos foram negativos para infecção por HBV.

Os critérios de exclusão foram pacientes em HD que não aderiram à hemodiálise por seis meses com mais de três sessões de diálise perdidas/mês, pacientes expostos a hospitalização, cirurgias de grande porte, episódios de sangramento do trato gastrointestinal, coagulação do acesso ou bacteremia ou outras infecções em 4 semanas antes da coleta de sangue, gravidez, pacientes com doença renal policística, infecção por HBV, distúrbios hematopoiéticos (incluindo mieloma múltiplo), cirrose hepática descompensada, hiperparatireoidismo, pacientes tratados com interferon e/ou ribavirina e/ou pacientes

com histórico de transfusão de sangue nos últimos seis meses.

As amostras de sangue foram retiradas e os seguintes parâmetros bioquímicos foram medidos: nível sérico de albumina, nível sérico de bilirrubina total, nível sérico de alanina aminotransferase (ALT), nível sérico de fosfatase alcalina (ALP), nível sérico de aspartato aminotransferase (AST), uréia, creatinina, sódio e potássio. Também foram avaliados hemograma completo, ferro total, níveis séricos de ferritina e eritropoietina. O nível de hepcidina foi medido pela técnica quantitativa de imunoenensaio enzimático tipo sanduíche (Sun Red Company, China)

GENOTIPAGEM DE SNPS IL-6

As amostras de sangue foram coletadas em tubos estéreis com EDTA. O DNA genômico foi isolado do sangue total, segundo as instruções do fabricante (Qiagen Ltd., UK).

A IL-6 (-174 G/C) rs1800795 foi genotipada usando um método de reação em cadeia da polimerase mutagênica separada (MS-PCR)¹⁵. A reação foi realizada em um tubo contendo os dois alelos. As misturas de PCR consistiram da DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.), 10 pmol de cada primer específico de alelo, 10 pmol de anti-sense primer e 100 ng de DNA. As condições de ciclagem da PCR consistiram em 95°C por 10 min [1 ciclo], seguidas por 94°C por 30 segundos, 66°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos [40 ciclos] e, finalmente, 72°C por 7 min [1 ciclo]. Um amplicon de 136 pb (alelo C) e 121 pb (alelo G) foi demonstrado usando eletroforese em gel de agarose a 4% e o tamanho dos produtos de PCR foi determinado em relação à migração de uma escada com degraus de 25 pb.

As IL-6 -572 G/C rs1800796 e -597 G/A rs1800797 foram genotipadas usando o método de primer específico da sequência (PCR-SSP). A sequência de primers para IL-6 -572 G/C e -597 G/A foi projetada usando a ferramenta em [HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast), de acordo com Talaat et al. (Tabela 1). A reação de PCR consistiu em 25 µL em dois tubos, um para cada alelo. As condições térmicas do ciclo foram de 94°C por 2 min (1 ciclo), seguidas de 96°C por 25s, 70°C por 45s e 72°C por 20s (5 ciclos), seguidas por 96°C por 25s, 65°C por 5s e 72°C por 45s (11 motocicletas) e, finalmente, 96°C por 25 s, 55°C por 60s e 72°C por 2 min (15 ciclos).

Os primers de IL-6-572 G/C resultaram em um amplicon de 325 pb e 473 pb para IL-6 -597 G/A. O tamanho dos produtos de PCR foi determinado em relação à migração em uma escada de 100 pb usando eletroforese em gel de agarose a 2%.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 19 (LEAD Technology Inc.). Os dados são apresentados como médias com o desvio padrão correspondente (DP). Comparações entre diferentes grupos foram realizadas por um teste-t independente. Cada polimorfismo foi examinado na população controle para corroborar que a distribuição dos genótipos confirmou as expectativas de Hardy-Weinberg (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) (HWE). A ferramenta online SNP stats (<http://bioinfo.iconcolgia.net/SNPstats>) foi utilizada para realizar as análises de haplótipos e calcular os parâmetros de LD (D' e r^2). As frequências de genótipo, alelo e haplótipo foram comparadas entre casos e controles usando um teste do qui-quadrado (χ^2). O odds ratio (OR) e os intervalos de confiança de 95% (IC) foram calculados para avaliar o risco associado a um alelo, genótipo ou haplótipo específico.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS BASAIS DO PACIENTE

As características basais dos 80 pacientes em hemodiálise crônica (HD) estão apresentadas na Tabela 2. A amostra incluiu 49 homens e 31 mulheres com idade média de $52,26 \pm 12,28$ anos. Os 40 pacientes em HD negativos para HCV eram 27 homens e 13 mulheres, com idade média de $51,42 \pm 2,14$ anos, rotulados como grupo 1 e os 40 pacientes em HD positivos para HCV eram 22 homens e 18 mulheres, com idade média de $53,10 \pm 1,73$ anos, rotulados como grupo 2. O nível de ferro sérico aumentou significativamente ($P \leq 0,001$) nos pacientes HCV positivos ($391,65 \pm 32,43$) em comparação com o grupo HCV negativos ($108,07 \pm 11,57$) (Tabela 2). Da mesma forma, Hb, hematócrito e ferritina ($9,81 \pm 0,24$, $28,54 \pm 0,78$, $998,62 \pm 90,19$, respectivamente) estavam significativamente elevados ($P \leq 0,001$, $P \leq 0,001$, $P \leq 0,01$, respectivamente) em pacientes em HD positivos para HCV, em comparação com pacientes em HD negativos para HCV ($8,36 \pm 0,29$, $25,61 \pm 1,31$, $276,77 \pm 53,66$, respectivamente).

TABELA 1. PRIMERS USADOS PARA DETECTAR POLIMORFISMOS DA IL-6 EM PACIENTES EM HD NEGATIVOS E POSITIVOS PARA HCV.

Primer	Tamanho do produto
IL-6 (-174) G/C	
G Forward: 5'-GCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTACG-3'	121 bp
C Forward: 5'GACGACCTAAGCTTTACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGAC-3'	136 bp
Reverso: 5'-ATAAATCTTTGTTGGAGGGTGAGG-3'	
IL-6 (-572) G/C	
G Forward: 5'-GGCCAGGCAGTTCTACAACAGCCG-3'	
C Forward: 5'-GGCCAGGCAGTTCTACAACAGCCC-3'	325bp
Reverso: 5'-ATTAGTGACTCAGCACTTTGG-3'	
IL-6 (-597) G/A	
G Forward: 5'-AAGTAACTGCACGAAATTTGAGGG-3'	
A Forward: 5'-AAGTAACTGCACGAAATTTGAGGA-3'	473 bp
Reverso: 5'-TGTGCAATGTGACGTCCTTTA-3'	

TABELA 2. DADOS DEMOGRÁFICOS E MARCADORES DA SITUAÇÃO DO FERRO NA POPULAÇÃO ESTUDADA, INCLUINDO OS PACIENTES EM HD NEGATIVOS E POSITIVOS PARA HCV.

	HCV -ve HD	HCV + ve HD	P
	N= 40	N= 40	
Dados demográficos			
Sexo (Masc./ Fem.)	27/13	22/18	NS
Idade (anos)	51,42 ± 2,14	53,10 ± 1,73	NS
Duração da HD (anos)	2,20 ± 0,41	4,90 ± 0,63	P < 0,001
Parâmetros do ferro			
Hemoglobina (g/dL)	8,36 ± 0,29	9,81 ± 0,24	P < 0,001
Hematócrito (%)	25,61 ± 1,31	28,54 ± 0,78	P < 0,001
VCM (fl)	83,94 ± 1,09	87,08 ± 1,15	P < 0,001
HCM (pg)	28,38 ± 0,44	29,96 ± 0,45	P < 0,01
CCMH (g/dL)	33,91 ± 0,30	41,98 ± 7,50	NS
Ferritina (ng/mL)	276,77 ± 53,66	998,62 ± 90,19	P < 0,01
Ferro (µg/dL)	108,07 ± 11,57	391,65 ± 32,43	P < 0,001
Hepcidina (ng/mL)	570,64 ± 59,38	595,86 ± 52,96	NS
Dose da eritropoietina (UI/semana)	4480 ± 200	4800 ± 240	NS

Não foi encontrada diferença estatística no nível de hepcidina nos pacientes em HD positivos para HCV (595,86 ± 52,96), em comparação aos pacientes em HD negativos para HCV (570,64 ± 59,38).

GENÓTIPOS DE IL-6 E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

A frequência dos genótipos -572 G/C para IL-6 não se desviou significativamente do equilíbrio HWE. No entanto, os valores previstos pelo valor pressuposto do HWE foram diferentes dos observados para o genótipo IL-6 -174 G/C GG, GC e CC [9 (22,5%), 31 (77,5%), 0 (observado) v.s. 15,01 (37,5%), 18,99 (47,5%), 6,01 (15%) (previsto)

(P≤0,001)] em pacientes em HD, negativos para HCV. A frequência dos genótipos IL-6 -597G/A desviou-se significativamente do HWE para GG, GA, AA [8 (20%), 29 (72,5%), 1 (2,5%) (observado) v.s. 13,68, 17,64, 5,68 (previsto) (P≤0,001)] em pacientes em HD positivos para HCV.

A Tabela 3 mostra a distribuição dos alelos e genótipos de IL-6. Foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes em HD, negativos e positivos para HCV nas frequências de IL-6 -174 G/C (P≤0,01). Houve um aumento significativo na frequência do genótipo -174 GG (P < 0,01, OR = 4,66, IC 95% = 1,76-12,31) nos

pacientes em HD, positivos para HCV comparados aos pacientes em HD negativos para HCV, e uma significativa redução na frequência do genótipo GC -174 ($P < 0,01$, OR = 0,16, IC 95% = 0,06–0,45) em pacientes em HD positivos para HCV comparados com os negativos. As frequências dos alelos G também foram maiores entre os pacientes em HD positivos para VHC do que negativos (77,5% vs. 61,25%, $P \leq 0,05$, OR = 2,17, IC 95% = 1,09–4,35). Por outro lado, não foi registrada diferença significativa na frequência de SNP na IL-6 -572 entre pacientes em HD positivos e negativos para HCV

A análise do SNP IL-6 -597 G/A revelou uma diferença significativa na distribuição de diferentes genótipos entre pacientes em HD positivos e negativos para HCV ($P \leq 0,001$). Pacientes em HD positivos para HCV apresentaram frequência aumentada de

IL-6 -597 G/A vs. pacientes em HD negativos para HCV ($P \leq 0,01$, OR = 6,15, IC 95% = 2,33–16,21). As frequências dos alelos A também foram mais altas entre os pacientes em HD positivos para HCV em comparação aos negativos (39,2% vs. 15,4%, $P \leq 0,01$, OR = 3,54, IC 95% = 1,63–7,67).

Analisamos o padrão de desequilíbrio de ligação (DL) entre os SNPs. Houve DL entre IL-6 -174 G/C e IL-6 -572 G/C ($r^2 = 0,00086$ e $D' = 0,9975$), entre IL-6 -174 G/C e IL-6 -597 G/A ($r^2 = 0,0038$ e $D' = 0,7486$) e entre IL-6-550 G/C e IL-6 -597 G/A ($r^2 = 0,00068$ e $D' = 0,3699$).

Conforme mostrado na Tabela 4, as frequências de haplótipos de IL-6 -174 G/C, -572 G/C e -597 G/A em pacientes em HD positivos para HCV demonstraram um aumento significativo nos haplótipos de IL-6 GGA e CGA ($P \leq 0,01$ e $P \leq 0,001$, respectivamente).

TABELA 3. DISTRIBUIÇÕES DOS GENÓTIPOS DE IL-6 (-174 G/C, -572 G/C, E -597 G/A) E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS EM PACIENTES EM HD NEGATIVOS E POSITIVOS PARA HCV.

Variantes da IL - 6	HCV -ve HD N= 40	HCV +ve HD N= 40	Valor de P	OR (95% IC)
Genótipo IL-6 (-174G/C)				
G/G	9 (22,5%)	23(57,5%)	$P < 0,01$	4,66(1,76-12,31)
G/C	31(77,5%)	16(40%)	$P < 0,01$	0,16(0,06-0,45)
C/C	0 (0%)	1(2,5%)	NS	1,02 (0,97-1,07)
GCCC	31(77,5%)	17(42,5%)	$P < 0,01$	0,21(0,08-0,56)
Frequência alélica IL-6 (-174G/C)				
G	49 (61,25%)	62(77,5%)	$P < 0,05$	2,17(1,09-4,35)
C	31(38,75%)	18(22,5%)	$P < 0,05$	0,45 (0,23-0,91)
Genótipo IL-6 (-572 G/C)				
G/G	29 (72,5%)	34(85,0%)	NS	2,14(0,70-6,53)
G/C	8 (20,0%)	5(12,5%)	NS	0,57(0,16-1,92)
C/C	1(2,5%)	0	NS	0,97(0,92-1,02)
GCCC	9(22,5%)	5(12,5%)	NS	0,49(0,14-1,62)
Frequência alélica IL-6 (-572 G/C)				
G	68(87,2%)	73(93,6%)	NS	2,14,(69-6,60)
C	10(12,8%)	5(6,4%)	NS	0,46(0,15-1,43)
Genótipo IL-6 (-597 G/A)				
G/G	27(67,5%)	8(20,0%)	$P < 0,001$	0,12(0,04-0,33)
G/A	12(30,0%)	29(72,5%)	$P < 0,001$	6,15(2,33-16,21)
A/A	0	0		
GAAA	12(30,0%)	29 (72,5%)	$P < 0,001$	6,15(2,33-16,21)
Frequência alélica IL-6 (-597 G/A)				
G	66(84,6%)	45(60,8%)	$P < 0,01$	0,28(0,13-0,61)
A	12(15,4%)	29(39,2%)	$P < 0,01$	3,54(1,63-7,67)

OR, odds ratio; 95% CI, 95% intervalo de confiança. NS, não significativo. Comparamos o genótipo, alelo e frequências usando o teste de qui-quadrado (χ^2). $P < 0,05$ foi considerado significativo.

TABELA 4. IL-6 (-174G/C, -572G/C, E-597G/A) HAPLÓTIPOS EM PACIENTES EM HD.

Variantes IL - 6	HCV -ve HD N= 40	HCV +ve HD N= 40	Valor de P	OR (95% IC)
GGG	37,8%	52,52%	-	1,00
CGG	39,02%	9,28%	P<0, 01	0,09 (0,02 - 0,36)
GGA	9,49%	20,81%	P<0,01	8,71 (2,09 - 36,26)
GCA	6,69%	4,87%	NS	2,08 (0,14 - 31,21)
GCG	7%	0	NS	0,00 (-∞-∞)
CGA	0	12,09%	P<0,001	0,00 (-∞-∞)

OR, odds ratio; 95% CI, 95% intervalo de confiança. NS, não significativo. Comparamos o genótipo, alelo e frequências usando o teste de qui-quadrado (χ^2). P < 0,05 foi considerado significativo.

Ao mesmo tempo, houve uma redução significativa no haplótipo CGG (P≤0,01).

ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES DE ANEMIA E IL-6 POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES EM HD COM HCV

nos pacientes em HD, negativos para HCV, os marcadores de anemia não diferiram significativamente nos genótipos IL-6-572 G/C e IL-6 -597. O nível de hepcidina aumentou significativamente (P≤0,05) no genótipo IL-6 GC (640,18 ± 399,44) em comparação com o genótipo IL-6 GG (331,09 ± 78,14). Por outro lado, o nível de ferritina foi significativamente elevado (P≤0,01) no genótipo IL-6 GG (307,54 ± 372,98) do que o genótipo GC IL-6 (167,34 ± 93,34) (Tabela 5). Os marcadores de anemia não diferiram significativamente em nenhum dos SNPs de IL-6 avaliados em pacientes em HD positivos para HCV (Tabela 6).

DISCUSSÃO

Altos níveis circulantes de IL-6 foram documentados em várias condições inflamatórias clínicas, incluindo doenças hepáticas, como hepatite crônica viral¹⁶, e várias doenças em pacientes com doença renal em estágio terminal^{17,18}.

Estudos sobre polimorfismos dos genes das citocinas sugerem que a herança de alguns genótipos relacionados aos polimorfismos dos genes das citocinas, como o gene IL-6, afeta claramente a produção de citocinas, e talvez hospede fatores genéticos associados à progressão do HCV¹⁹. Com esta visão geral, o presente estudo foi planejado para identificar a relação entre a IL-6 e a regulação do ferro em pacientes egípcios soropositivos para hepatite C crônica em HD regular.

A duração da HD foi significativamente maior em pacientes positivos para HCV do que em pacientes negativos para HCV, pois os pacientes com infecção por HCV passaram um tempo significativamente

maior (P≤0,001) em hemodiálise do que aqueles sem infecção por HCV. Esses achados foram corroborados por Saifan et al.²⁰

Não foi encontrada diferença significativa no nível de hepcidina entre os grupos. Esse resultado está de acordo com os dados de Fujita et al.²¹, que afirmaram que não há relação entre a carga de RNA do HCV e a hepcidina sérica, corroborado pelos dados de Ibrahim et al.²² que concluíram que não há diferença significativa no nível de hepcidina entre pacientes em HD negativos e positivos para HCV.

Isso pode ser explicado por uma multiplicidade de fatores que influenciam o nível de hepcidina. Enquanto a inflamação e o tratamento da HD podem aumentar seu nível, e tanto a anemia quanto a deficiência de ferro podem diminuir seu nível. Além disso, a infecção pelo HCV pode prejudicar a capacidade hepática de secretar hepcidina, o que pode ter implicações importantes no tratamento da anemia em pacientes em HD infectados pelo HCV²².

Houve uma elevação altamente significativa (P≤0,001) do nível de ferro entre os pacientes em HD, positivos para HCV. Ao mesmo tempo, a ferritina também estava altamente elevada (P≤0,01) em pacientes em HD positivos para HCV em comparação com os negativos. Esses resultados estão de acordo com aqueles do estudo de Shan et al.²³ em população norte-americana, que afirmou haver associação entre infecção pelo HCV e níveis mais altos de ferro sérico e ferritina. Além disso, Sabry et al.²⁴ afirmaram que pacientes com doença renal terminal e positivos para HCV parecem ter maior ferro sérico e ST em comparação com pacientes negativos para HCV; além disso, houve uma diferença significativa no ferro sérico e ferritina entre os grupos.

Nosso estudo mostrou um aumento na frequência dos genótipos IL-6 -174 G/C G/G, C/G e GCCC nos pacientes em HD positivos para HCV do que naqueles negativos, sugerindo que a suscetibilidade

TABELA 5. MARCADORES DA SITUAÇÃO DO FERRO NOS GENÓTIPOS IL-6 (-174 G/C, -572 G/C E -597 G/A) EM PACIENTES EM HD NEGATIVOS PARA HCV.

	Hemoglobina	Hematócrito	Hemácias	VCM	HCM	CCMH	Ferritina	Ferro	Hepcidina
IL-6 (-174)									
GG	9,41 ± 1,56	27,22 ± 3,98	3,28 ± 0,43	83,27 ± 6,63	28,62 ± 2,64	34,42 ± 1,86	896,06 ± 628,30	295,22 ± 106,17	331,09 ± 78,14
GC	8,05 ± 1,84	25,14 ± 9,20	4,58 ± 6,84	84,14 ± 7,07	28,31 ± 2,91	33,76 ± 1,98	1028,39 ± 560,03	419,64 ± 219,34	640,18 ± 399,44
Valor de P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P < 0,05
IL-6 (-572 G/C)									
GG	8,16 ± 1,81	25,28 ± 9,02	3,72 ± 4,93	84,40 ± 6,59	28,52 ± 2,57	33,91 ± 1,80	1075,51 ± 546,50	422,77 ± 199,54	590,86 ± 385,79
GC	8,74 ± 1,82	26,06 ± 5,49	6,53 ± 9,56	82,55 ± 8,68	27,73 ± 3,94	33,59 ± 2,53	633,99 ± 650,37	295,88 ± 208,48	516,53 ± 370,94
CC	11,7	32,1	3,96	81,1	29,5	36,4	1532,21	193	376,74
Valor de P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IL-6 (-597 G/A)									
GG	8,35 ± 1,97	24,53 ± 5,47	4,88 ± 7,16	83,41 ± 7,33	28,24 ± 3,03	33,95 ± 2,10	1015,30 ± 516,62	403,57 ± 192,25	566,82 ± 363,55
GA	8,39 ± 1,63	28,13 ± 12,73	2,93 ± 0,58	85,20 ± 5,88	28,73 ± 2,37	33,82 ± 1,66	959,71 ± 704,35	363,83 ± 239,40	579,57 ± 419,08
AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valor de P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Todos os dados são apresentados como média ± DP. N: número de casos, VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CCMH: Concentração Corpuscular Média de Hemoglobina, e NS: não-significativo. Diferenças entre os grupos quando comparados pelo teste ANOVA. P < 0,05 é considerado significativo.

TABELA 6. Marcadores da situação do ferro nos genótipos de IL-6 (-174G/C, -572 G/C e -597 G/A) em pacientes em HD positivos para HCV.

	Hemoglobina	Hematócrito	Hemácias	VCM	HCM	CCMH	Ferritina	Ferro	Hepcidina
IL-6 (-174 G/C)									
GG	9.97± 1.56	28.86± 4.81	3.37±0.63	86.32± 7.50	29.86±3.20	47.68± 2.51	307.54 ±372.98	112.04±83.11	605.19±347.86
GC	9.68± 1.55	28.05 ±5.42	3.21 ±0.58	87.78 ±7.19	30.29±2.37	34.61 ±1.23	167.34 ±93.34	99.93±60.01	600.88± 329.07
CC	8.40	29.00	3.10	93.70	27.00	28.90	1320.00	147.00	300.83
Valor de P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	P<0.01	NS	NS
IL-6 (-572 G/C)									
GG	9.74 ±1.46	28.29±4.44	3.27 ±0.58	87.09 ±7.35	29.97± 3.00	43.04 ±50.70	292.61± 357.69	114.45± 75.80	594.41 ±329.20
GC	10.34 ±2.09	30.28 ±8.17	3.46 ±0.71	87.04± 7.69	29.90 ±1.80	34.54± 2.30	165.90± 134.61	63.40± 23.29	606.01 ±415.49
CC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valor de P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
IL-6 (-597 G/A)									
GG	10.13± 0.86	30.09 ±2.56	3.53 ±0.45	85.94 ±7.28	28.93± 3.21	60.99 ±90.66	397.32± 452.57	140.63± 76.54	566.54 ±315.84
GA	9.69± 1.72	27.95± 5.52	3.20 ±0.62	87.52± 7.38	30.35±2.67	34.77 ± 1.66	231.04± 281.83	95.72±69.24	606.98 ±346.68
AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valor de P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Todos os dados são apresentados como média ± DP. N: número de casos, VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CCMH: Concentração Corpuscular Média de Hemoglobina, e NS: não-significativo. Diferenças entre os grupos quando comparados pelo teste ANOVA. P < 0,05 é considerado significativo.

dos pacientes em HD positivos para HCV pode influenciar a frequência de IL-6. Em relação à frequência do alelo, uma mudança não significativa foi demonstrada nos alelos G e C nos dois grupos, embora o alelo G tenha diminuído significativamente em comparação com o alelo C. Esses resultados estão de acordo com aqueles de Bennermo et al.²⁵, que concluíram que o gene da IL-6 estava associado a uma variedade de doenças importantes como o HCV. Além disso, nossos resultados coincidem com Nasr.²⁶, que relataram que o genótipo e polimorfismo da IL-6 estavam relacionados à presença e ao desfecho do HCV. Enquanto Giannitrapani et al.²⁷ não encontraram diferença significativa em relação ao genótipo nem às frequências alélicas do polimorfismo estudado entre os três grupos. Além disso, Giannitrapani et al.²⁸ demonstraram a possibilidade de uma associação genética entre o polimorfismo IL-6 -174 G/C e algumas doenças hepáticas específicas, pois observavam uma correlação entre a presença do genótipo de alta produção (GG) e uma pior evolução do HCV.

O polimorfismo na posição IL-6 -174 G/C é um dos vários polimorfismos de IL-6 que foram sugeridos como impactantes na expressão de IL-6^{29,30}. De acordo com nossos achados, há evidências de uma associação genética entre o genótipo de IL-6 -174 G/C, exceto C/C, e a suscetibilidade aos pacientes em HD positivos para HCV. Esse resultado é contraditório com os resultados de Hirschhorn et al.³¹ e Rothman et al.³². O estudo de Liu et al.³³ mostrou associações nulas entre IL-6 -174 G/C e vários tipos comuns de câncer, incluindo mama, colorretal, próstata, pulmão, câncer gástrico, linfoma, mieloma múltiplo e melanoma.

Ao estudar o polimorfismo de IL-6 na posição -597 G/A, observou-se uma diferença altamente significativa na taxa de transporte do alelo 'A' em pacientes em HD positivos para HCV e altamente significativa no alelo 'G' em pacientes em HD negativos para HCV ($P < 0,01$), para ambos os grupos. Esses resultados concordam com aqueles de Park et al.³⁴ que estudaram a associação da IL-6 na população coreana com hepatite, e Falletti et al.³⁵ que observaram

que o polimorfismo IL-6 -597 G/A estava relacionado à presença e ao resultado da infecção pelo HCV. Cussigh et al.³⁶, que descreveram o IL-6 -597 G/A, parecem favorecer uma doença progressiva pelo HCV. Em contraste com o nosso estudo, Lu et al.³⁷ não encontraram diferença significativa nas

frequências do alelo ou genótipo IL-6 -597 G/A entre os pacientes com HCV e o grupo controle.

Citocinas pró-inflamatórias interagem com a hematopoiese em vários estágios. A síntese de hepcidina e ferritina é induzida por IL-6³⁸. Polimorfismos genéticos de genes de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 podem desempenhar um papel crucial na anemia causada por doenças renais crônicas³⁹.

Houve uma correlação significativa ($P < 0,05$) entre os níveis de IL-6 -174 G/C GC e os níveis de hepcidina na população em HD negativa para HCV. Em pacientes em HD, a maior produção de IL-6 tem sido associada ao genótipo IL-6 -174 G/C GC⁴⁰. Assim, o nível de hepcidina pode estar aumentado em pacientes com genótipo GC de IL-6 (-174 G/C), e isso corrobora nosso resultado. Por outro lado, o nível de ferritina apresentou correlação significativa ($P < 0,01$) com o genótipo CC de IL-6 (-174 G/C). Sabry et al.²⁴ demonstraram que a ferritina sérica estava significativamente aumentada em pacientes em HD positivos para HCV em comparação com pacientes em HD negativos para HCV. O polimorfismo genético da IL-6 não mostrou correlação com anemia em pacientes em HD positivos para HCV.

CONCLUSÕES

Em conclusão, nosso estudo preliminar indicou que os polimorfismos IL-6 (-174 G/C e -597 G/A) podem desempenhar um papel na suscetibilidade ao HCV em pacientes em HD, e os polimorfismos IL-6 -174 G/C podem ter participação na regulação dos níveis de hepcidina e ferro em pacientes em HD. Finalmente, são necessários estudos prospectivos mais extensos para confirmar nossos achados.

DISPONIBILIDADE DE DADOS

Os conjuntos de dados gerados e analisados durante nosso estudo estão disponíveis com o autor correspondente, mediante solicitação razoável.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

YBMA, SGM e IHE conceberam e projetaram o estudo. YBMA, SGM e SMS participaram do estudo experimental e aquisição de dados. MAD participou do estudo clínico. YBMA e SMS analisaram e/ou interpretaram os dados. SGM redigiu o manuscrito. YBMA e IHE revisaram criticamente o manuscrito em busca de conteúdo intelectual importante. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não têm interesses conflitantes.

REFERÊNCIAS

1. Becherucci F, Roperto RM, Materassi M, Romagnani P. Chronic kidney disease in children. *Clinical Kidney Journal*. 2016 Aug 1;9(4):583-91.
2. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *The Lancet*. 2013 Jul 20;382(9888):260-72.
3. Brattich M. Comorbid diseases in patients on dialysis: the impact on anemia. *Nephrology Nursing Journal*. 2007 Jan 1;34(1).
4. Agarwal SK, Dash SC, Gupta S, Pandey RM. Hepatitis C virus infection in haemodialysis: the 'no-isolation' policy should not be generalized. *Nephron Clinical Practice*. 2009;111(2):c133-40.
5. Etik DO, Ocal S, Boyacioglu AS. Hepatitis C infection in hemodialysis patients: A review. *World journal of hepatology*. 2015 Apr 28;7(6):885
6. Soliman AR, Momtaz Abd Elaziz M. Evaluation of an isolation program of hepatitis C virus infected hemodialysis patients in some hemodialysis centers in egypt. *ISRN nephrology*. 2012 Oct 31;2013.
7. El Said HW, Abou Seif KH, Ahmed YS, Abou Elleil HA, El Said TW, Behairy MA, Mohamed MM, Ahmed FA. Relationship of serum haemojuvelin and hepcidin levels with iron level and erythropoietin requirement in prevalent hepatitis C virus positive haemodialysis patients. *Nephrology*. 2018 Apr;23(4):323-30.
8. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of clinical investigation*. 2004 May 1;113(9):1271-6.
9. De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008 Jan;9(1):72.
10. Costa E, Swinkels DW, Laarakkers CM, Rocha-Pereira P, Rocha S, Reis F, Teixeira F, Miranda V, do Sameiro Faria M, Loureiro A, Quintanilha A. Hepcidin serum levels and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in haemodialysis patients. *Acta haematologica*. 2009;122(4):226-9.
11. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, Goldberg YP, Sakellaropoulos N, Ganz T, Nemeth E. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood*. 2005 May 15;105(10):4103-5.
12. Ryu J. and Eung-Jun Kim S. Interleukin-6 -634 C/G and -174 G/C Polymorphisms in Korean Patients Undergoing Hemodialysis. *Korean J Intern Med*. 2012 Sep; 27(3): 327-337.
13. Talaat RM, Abdelkhalik MS, El-Maadawy EA, Abdel-Mageed WS, El-Shenawy SZ, Osman MA. Association of TNF-Alpha gene polymorphisms and susceptibility to hepatitis B virus infection in Egyptians. *Human immunology*. 2017 Nov 1;78(11-12):739-46.
14. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology*. 2015 May;16(5):448.
15. Talaat RM, Abdel-Aziz AM, El-Maadawy EA, Abdel-Bary N. CD38 and interleukin 6 gene polymorphism in Egyptians with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Immunological investigations*. 2015 Apr 3;44(3):265-78.
16. Radovic M1, Jelkmann W, Djukanovic L, Ostric V. Serum erythropoietin and interleukin-6 levels in hemodialysis patients with hepatitis virus infection.. *J Interferon Cytokine Res*. 1999 Apr;19(4):369-73.
17. Buraczynska M, Jozwiak L, Ksiazek P, Borowicz E, et al. (2007). Interleukin-6 gene polymorphism and faster progression to end-stage renal failure in chronic glomerulonephritis. *Transl. Res*. 150:101-105.
18. Ryu JH and Kim SJ (2012). Interleukin-6 -634 C/G and -174 G/C polymorphisms in Korean patients undergoing hemodialysis. *Korean J. Intern. Med*. 27:327-37.
19. Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour necrosis factor- α , transforming growth factor- β , interleukin-10, interleukin-6, interferon- γ , and outcome of hepatitis C virus infection. *Journal of medical virology*. 2003 Oct 1;71(2):212-8.
20. Saifan C, El-Charabaty E, Kleiner M, El-Sayegh S. Effect of hepatitis C virus infection on erythropoiesis in patients on hemodialysis. *International journal of nephrology and renovascular disease*. 2013;6:121.
21. Fujita N, Sugimoto R, Motonishi S, Tomosugi N, Tanaka H, Takeo M, Iwasa M, Kobayashi Y, Hayashi H, Kaito M, Takei Y. Patients with chronic hepatitis C achieving a sustained virological response to peginterferon and ribavirin therapy recover from impaired hepcidin secretion. *Journal of hepatology*. 2008 Nov 1;49(5):702-10.
22. Ibrahim M, Gadalla H, Raslan H, Abou Ellet H, William E. Effect of hepatitis-C virus infection on serum hepcidin in hemodialysis patients. [Ain Shams University, Egypt]. *Anemia [M614]*. World Congress of Nephrology, Milano, Italy. 2009
23. Shan Y, Lambrecht RW, Bonkovsky HL. Association of hepatitis C virus infection with serum iron status: analysis of data from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clinical infectious diseases*. 2005 Mar 15;40(6):834-41.
24. Sabry A, El-Dahshan K, Mahmoud K, El-Husseini A, Sheashaa H, Abo-Zenah H. Effect of hepatitis C virus infection on haematocrit and haemoglobin levels in Egyptian hemodialysis patients. *Eur J Gen Med*. 2007;4(1):9-15.
25. Bennermo M, Held C, Green F, Strandberg LE, Ericsson CG, Hansson LO, Watkins H, Hamsten A, Tornvall P. Prognostic value of plasma interleukin-6 concentrations and the -174 G> C and -572 G> C promoter polymorphisms of the interleukin-6 gene in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis. *Atherosclerosis*. 2004 May 1;174(1):157-63.
26. Nasr MY, Deeb AS, Badra G, El Sayed IH. Lack of Any Relationship Between Circulating Autoantibodies and Interleukin-6 Levels in Egyptian Patients Infected with the Hepatitis C Virus. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2016;17(11):4977
27. Giannitrapani L, Soresi M, Giacalone A, Campagna ME, Marasa M, Cervello M, Marasa S, Montalto G. IL-6-174G/C polymorphism and IL-6 serum levels in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Omic: a journal of integrative biology*. 2011 Mar 1;15(3):183-6.
28. Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D, Licata A, Montalto G. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2013 Apr 28;19(16):2449.
29. Morozumi T, Sharma A, De Nardin E. The Functional Effects of the -455G/A Polymorphism on the IL-6-Induced Expression of the β -fibrinogen Gene may be due to Linkage Disequilibrium with Other Functional Polymorphisms. *Immunological investigations*. 2009 Jan 1;38(3-4):311-23.
30. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Jun 16;275(24):18138-44.
31. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genetics in Medicine*. 2002 Mar;4(2):45.
32. Rothman N, Skibola CF, Wang SS, Morgan G, Lan Q, Smith MT, Spinelli JJ, Willett E, De Sanjose S, Cocco P, Berndt SI. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *The lancet oncology*. 2006 Jan 1;7(1):27-38.

33. Liu S, Qiu XQ, Zeng XY, Bai H, Bei CH, Yang Y. Relationship between IL6-572G/C polymorphism and hepatocellular carcinoma in men. *Zhonghua gan zang bing za zhi= Zhonghua ganzangbing zazhi= Chinese journal of hepatology*. 2012 Jun;20(6):463-7.
34. Park BL, Lee HS, Kim YJ, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Shin HD. Association between interleukin 6 promoter variants and chronic hepatitis B progression. *Experimental & molecular medicine*. 2003 Apr;35(2):76.
35. Falletti E, Fabris C, Vandelli C, Colletta C, Cussigh A, Smirne C, Fontanini E, Cmet S, Minisini R, Bitetto D, Toniutto P. Genetic polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis C. *Human immunology*. 2010 Oct 1;71(10):999-1004.
36. Cussigh A, Falletti E, Fabris C, Bitetto D, Cmet S, Fontanini E, Bignulin S, Fornasiere E, Fumolo E, Minisini R, Pirisi M. Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C. *Immunogenetics*. 2011 Jan 1;63(1):33-41.
37. Lu Y, Wu Z, Peng Q, Ma L, Zhang X, Zhao J, Qin X, Li S. Role of IL-4 gene polymorphisms in HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *PLoS one*. 2014 Oct 8;9(10):e110061.
38. Zhang X, Rovin BH. Hecpudin expression by human monocytes in response to adhesion and pro-inflammatory cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2010 Dec 1;1800(12):1262-7.
39. Girndt M1, Stenvinkel P, Ulrich C, Axelsson J, Nordfors L, Barany P, Carrero JJ, Heine GH, Kaul H, Köhler H. Influence of cytokine gene polymorphisms on erythropoietin dose requirements in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Dec;22(12):3586-92.
40. Balakrishnan VS, Guo D, Rao M, Jaber BL, Tighiouart H, Freeman RL, Huang C, King AJ, Pereira BJ, HEMO Study Group. Cytokine gene polymorphisms in hemodialysis patients: association with comorbidity, functionality, and serum albumin. *Kidney international*. 2004 Apr 1;65(4):1449-60.