



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

IHOR BEKH

***Gene da Interleucina 6: um candidato de suscetibilidade
genética à hepatite tóxica induzida pela Isoniazida***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE GENÉTICA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSORA DOUTORA HENRIQUETA COIMBRA SILVA

PROFESSOR DOUTOR FERNANDO REGATEIRO

MARÇO/2016

Às pessoas mais importantes da minha vida.

Índice

Resumo	3
Abstract.....	4
Abreviaturas	5
Introdução.....	6
Materiais e métodos.....	9
Descrição da população.....	9
Extração de ADN.....	10
Quantificação e avaliação da pureza das amostras	11
PCR.....	11
Sequenciação do produto de PCR.....	13
Análise estatística	13
Resultados	15
IL-6 -597G/A (rs1800797)	15
IL-6 -572G/C (rs1800796)	15
Discussão	16
Conclusão	18
Agradecimentos	19
Bibliografia	20

Resumo

A tuberculose, pela sua incidência, morbidade e mortalidade, continua a ser um problema premente de saúde pública. A Isoniazida permanece um dos fármacos mais eficazes no seu tratamento, apresentando, no entanto, um efeito adverso grave e potencialmente fatal na forma de hepatotoxicidade. A hepatotoxicidade induzida pela Isoniazida é um fenótipo multifatorial, com componentes genéticos e não genéticos. Os fatores genéticos conhecidos conseguem explicar apenas uma minoria dos casos, pelo que foi realizado um estudo de gene candidato para averiguar se o polimorfismo rs1800797 (-597G/A) do gene da IL-6 era uma variante de suscetibilidade à hepatite tóxica induzida pela Isoniazida.

O ADN foi extraído a partir do sangue periférico de 157 doentes com tuberculose pulmonar submetidos a tratamento que incluía Isoniazida, 62 dos quais desenvolveram hepatotoxicidade. A genotipagem foi realizada por sequenciação de Sanger.

A análise estatística – teste de χ^2 e *odds ratio* – sugere que os genótipos com um alelo A (adenina) do gene da IL-6, homozigotos ou heterozigotos, têm um risco aumentado de hepatotoxicidade induzida pela INH comparativamente aos indivíduos homozigotos para o alelo G (guanina) (OR – 2.29 IC 95%; $P = 0.016$).

Os resultados obtidos são consonantes com evidências recentes sobre o papel crucial da IL-6 na regeneração hepática após agressão mecânica ou citotóxica e sobre a atividade imunogénica da Isoniazida como causa direta da lesão hepática.

Por fim, o trabalho sugere algumas pistas para a investigação futura.

Palavras-Chave: Hepatotoxicidade, Isoniazida, Interleucina 6.

Abstract

Tuberculosis, due to its incidence, morbidity and mortality, still represents a pressing public health problem. Isoniazid persists as one of the most effective drugs for its treatment, evidencing, however, a serious and potentially fatal adverse effect in the form of hepatotoxicity. Isoniazid-induced hepatotoxicity is a multifactorial phenotype, influenced both by genetic and non-genetic factors. Known genetic risks can only explain a minority of cases, so a candidate-gene study was performed in order to ascertain whether the rs1800797 polymorphism (-597G/A) of the IL-6 gene could be a variant of susceptibility for Isoniazid-induced toxic hepatitis.

The DNA for the study was obtained from peripheral blood of 157 patients with pulmonary tuberculosis undergoing Isoniazid treatment, 62 of whom developed hepatotoxicity. Genotyping was performed by the Sanger sequencing method.

Statistical analysis – χ^2 test and odds ratio – suggests that genotypes with an A allele (adenine) of the IL-6 gene, homozygous or heterozygous, have an increased risk of INH-induced hepatotoxicity when compared to homozygous individuals carrying the G allele (guanine) (OR – 2.29 CI 95%; P = 0.016).

The results are consistent with recent evidence on the crucial role of IL-6 in liver regeneration after mechanical or cytotoxic aggression and the immunogenic activity of isoniazid as a direct cause of liver damage.

Finally, the paper suggests some clues for future research.

Keywords: Hepatotoxicity, Isoniazid, Interleukin 6.

Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ALT – Alanina transaminase

AST – Aspartato transaminase

χ^2 – Chi-Quadrado

CYP2E1 – Citocromo P450 2E1

HT – Hepatotoxicidade

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

INH – Isoniazida

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

TB – Tuberculose

TNF – *Tumor Necrosis Factor*

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

Introdução

A tuberculose, desencadeada por bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, é uma doença infecciosa que, segundo os dados de 2014, afetava mundialmente mais de 9,6 milhões de pessoas, tendo sido responsável por 1,5 milhões de mortes nesse ano. Estima-se que 5 a 15% dos 2-3 mil milhões de portadores do microrganismo venham a desenvolver a doença ao longo da vida, sendo os indivíduos VIH positivos particularmente vulneráveis.(1)

A Isoniazida (INH), utilizada desde a década de 1950, continua a ser um fármaco de primeira linha no tratamento da tuberculose, consistindo o seu mecanismo de ação em inibir a síntese da parede celular do bacilo. O tratamento preconizado para a doença diagnosticada de novo pressupõe a toma da Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida e Etambutol durante 2 meses e da Isoniazida e Rifampicina nos 4 meses subsequentes; em contexto de profilaxia é consensual administrar a Isoniazida durante 6 a 9 meses ou esta associada a Rifampicina durante 3 meses.(2-4)

A INH é uma das principais causas de hepatites tóxicas agudas induzidas por fármacos, sendo esse o seu efeito secundário mais nocivo. Esta complicação ocorre em 10 a 15% dos indivíduos submetidos a terapêutica, podendo conduzir a hepatites fulminantes com necessidade de transplante hepático, ou mesmo à morte do doente. O problema é extensivo aos indivíduos sob terapêutica profilática, uma indicação que para além do contacto de risco com infetados, passou a incluir um número crescente de doentes submetidos a terapêuticas biológicas com anti-TNF. Quando em associação com a Rifampicina – um potente indutor enzimático – o risco de hepatotoxicidade aumenta.(5-8)

A suscetibilidade individual à hepatotoxicidade induzida pela INH é um fenótipo multifatorial e depende de fatores genéticos (múltiplas variantes de baixa penetrância), que condicionam o metabolismo do fármaco e a resposta imunoinflamatória do organismo, e fatores não genéticos, incluindo os ambientais. A influência ambiental inclui o microambiente celular (metabolismo celular), biológico individual (fatores hormonais e resposta imunoinflamatória) e meio ambiente externo, e para além do efeito direto, a sua participação no fenótipo hepatotoxicidade pode ocorrer por alteração dos perfis epigenéticos.(9)

A concentração sérica da Isoniazida é determinada em grande parte por polimorfismos da enzima N-acetiltransferase, codificada pelo gene *NAT2*. Em função do seu genótipo, os indivíduos podem ser classificados em acetiladores lentos, intermédios ou rápidos. Os acetiladores lentos têm 2 a 4 vezes o risco dos acetiladores rápidos de desenvolverem

hepatotoxicidade.(10) A variante *missense* V444A (rs2287622) do gene *ABCB11*, responsável pela codificação de uma proteína de transporte de sais biliares, tem sido de igual modo associada a lesão hepática de diversas etiologias.(11) Apesar de representarem um avanço significativo na compreensão dos fatores subjacentes à hepatotoxicidade induzida pela Isoniazida, as variantes do *NAT2* e do *ABCB11* não conseguem explicar muitos dos casos observados.(6,12,13)

A interleucina 6, uma citocina pleiotrópica que intervém na hematopoiese, oncogénese e combate de infeções, é responsável, nos hepatócitos, pela ativação, em resposta a agressão, das proteínas da fase aguda de resposta inflamatória.(14) Desempenha um papel igualmente importante ao nível da redução de suscetibilidade à tuberculose(15) e de constituição de resposta imune adquirida a essa infeção, bem como na regeneração do tecido hepático após lesão por meios físicos ou agentes químicos.(16–20)

O polimorfismo de tipo SNP rs1800797 (-597G/A), situado na região promotora do gene da IL-6, poderá ter um impacto na regulação da sua expressão, condicionando os níveis séricos da citocina. A frequência dos génotipos deste polimorfismo foi estudada em diferentes populações, verificando-se diferenças significativas entre as populações caucasianas, asiáticas e afro-americanas (Tabela 1).(21)

Tabela 1 – Frequência de IL-6 -597G/A (rs1800797) em várias populações descritas.

População	N	Frequência genotípica (%)			Frequência alélica (%)	
		GG	GA	AA	G	A
Checos	107	15.89	47.66	36.45	39.72	60.28
Finlandeses	483	21.33	46.79	31.88	44.72	55.28
Britânicos	127	36.22	53.54	10.24	62.99	37.01
Indianos	40	72.50	20.00	7.50	82.50	17.50
Afroamericanos	579	87.57	11.57	0.86	93.35	6.65
Coreanos	1024	99.51	0.49	0	99.76	0.24
Japoneses	189	100	0	0	100	0
Chineses (Han)	232	100	0	0	100	0
Chineses (Hui)	96	98.96	1.04	0	99.48	0.52

Legenda: N – número de indivíduos estudados

Adaptado a partir de: *Interleukin-6 genotypes and serum levels in Chinese Hui population*

Realizou-se um estudo de gene candidato com o objetivo de verificar se o polimorfismo rs1800797 do gene da IL-6 era uma variante de suscetibilidade à hepatite tóxica induzida pela Isoniazida. Este trabalho faz parte integrante de um projeto de investigação que pretende identificar genes de suscetibilidade a este fenótipo e averiguar o benefício da terapêutica personalizada da INH baseada na genotipagem comparativamente com o tratamento padronizado.

Materiais e métodos

Descrição da população

Estudaram-se 157 indivíduos – de raça caucasiana – não consanguíneos e com diagnóstico de tuberculose pulmonar. Foram excluídos os candidatos com antecedentes de doença alcoólica hepática, infecção por VIH e hepatites B e C. O plano terapêutico de todos os participantes incluía a Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida e Etambutol. Os resultados dos testes de função hepática – antes de se ter iniciado o tratamento – revelaram valores de transaminases, ALT e AST, dentro dos limites da normalidade. As características da população são resumidas na tabela 2.

Foram retrospectivamente selecionados indivíduos que tinham desenvolvido hepatotoxicidade e incluídos todos os que durante o período do estudo (2011-2015) a desenvolveram. Os doentes foram tratados no CHUC (Dr.^a Celeste Alcobia) e nos Centros de Diagnóstico Pneumológico do Centro (Dr.^a Celeste Alcobia) e Vendas Novas (Dr. Miguel Vilar).

Tabela 2 – Características da população estudada.

Caraterísticas	Homens		Mulheres	
	N (%)	Idade média	N (%)	Idade média
Geral	48 (50.5)	50 anos dp -16.83	47 (49.5)	46 anos dp -15.6
Com HT	29 (46.8)	52 anos dp -16.5	33 (53.2)	48 anos dp -15.8

N – número de participantes; **HT** – hepatotoxicidade; **dp** – desvio padrão

Todos os participantes foram classificados em função do grau de hepatotoxicidade que manifestaram no decurso da terapêutica (Tabela 3), tendo-se considerado como ligeira para valores das enzimas ALT e AST 1.5 vezes superiores aos valores de referência do laboratório, e como hepatite tóxica para níveis 3 vezes superiores na presença de sintomas ou ≥ 5 vezes superiores na sua ausência.

Tabela 3 – Classificação do grau de hepatotoxicidade.

Grau	Descrição	N (%)
0	Sem hepatotoxicidade	95 (60.51)
1	Hepatotoxicidade ligeira	20 (12.74)
2	Hepatite tóxica	39 (24.84)
3	Necessidade de transplante ou morte	3 (1.91)

Todos os participantes foram informados sobre o estudo e assinaram o consentimento informado. O estudo foi aprovado pela comissão de ética dos HUC (atual CHUC).

Extração de ADN

O ADN foi extraído a partir do sangue periférico dos doentes que aceitaram participar no estudo através do Kit QIAamp DNA mini Kit® (Qiagen, Hilden, Germany).

De início, procedeu-se ao isolamento do “*buffy coat*” por centrifugação em coluna de Lymphoprep. Após lavagem com PBS e centrifugação (20.000 x g durante 3min), as células foram ressuspensas em PBS até perfazer 200µl; adicionaram-se posteriormente 20µl de proteinase K e 200µl de tampão AL, agitando-se a mistura no vórtex por 15s e deixando-se na incubadora a 56°C durante 10min. Adicionaram-se depois 200µl de etanol (96-100%), com sucessiva agitação de 15s no vórtex, colocou-se o produto resultante na coluna QIAamp (aplicada num tubo coletor) e centrifugou-se a 6.000 x g durante 1min. Prosseguiu-se com a substituição do tubo coletor por outro, aplicando-se de seguida 500µl de tampão AW1 e centrifugando-se de novo a 6.000 x g por 1min. Recorreu-se ao mesmo procedimento para 500µl de tampão AW2 mas com uma centrifugação de 20.000 x g durante 3min. De forma a assegurar a total eliminação do tampão AW2, foi substituído o tubo coletor e voltou-se a realizar a centrifugação, mas apenas por 1min. No passo seguinte, mudou-se a coluna para um tubo de 1,5ml e acrescentaram-se 100 a 200µl de tampão AE. Após 5min, o produto foi centrifugado a 6.000 x g durante 1min, com posterior preservação do eluído a -20°C até a sua quantificação.

Quantificação e avaliação da pureza das amostras

Depois da quantificação do ADN das amostras, foi avaliado o seu grau de pureza através de espectrofotometria – com a leitura das absorvâncias dos comprimentos de onda de 260/280nm e 260/230nm – sendo considerado como normal o valor compreendido entre 1,8-2,0 e 1,8-2,2, respetivamente. Esta determinação foi realizada com recurso ao aparelho de espectrofotometria Nanodrop (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific).

PCR

Um segmento do gene da IL-6 incluindo o rs1800797 e um outro SNP, o rs1800796, (Fig. 1) foi amplificado utilizando os *primers* apresentados na tabela 4.(22)

```
4201 caaacctctg gcacagagag caaagtcctc actgggagga ttccaaggg gtcacttggg
4321 agagggcagg gcagcagcca acctcctcta agtgggctga agcaggtgaa gaaagtggca
4381 gaagccacgc ggtggcaaaa aggagtcaca cactccacct ggagacgcct tgaagtaact
4441 tca-bgaaatt tgagg-tggc caggcagttc tacaacagcc g-ctcacaggg agagccagaa
4501 cacagaagaa ctcagatgac tggtagtatt accttcttca taatcccagg cttggggggc
4561 tgcgatggag tcagaggaaa ct-agttcag aacatctttg gtttttataa atacaaatta
4621 actggaacgc taaattctag cctgttaatc tggtcactga aaaaaaattt ttttttttc
4681 aaaaaacata gctttagctt attttttttc tctttgtaa acttcgtgca tgacttcagc
4741 tttactcttt gtcaagacat gccaaagtgc tgagtcacta ataaaagaaa aaaagaaagt
4801 aaaggaagag tggttctgct tcttagcgtc agcctcaatg acgacctaag ctgcactttt
4861 ccccctagtt gtgtcttgcc atgctaaagg acgtcacatt gcacaatctt aataaggttt
4921 ccaatcagcc ccaccgcctc tggcccacc ctcaccctcc aacaaagatt tatcaaatgt
4981 gggattttcc catga-gtctc aatattagag tctcaacccc caataaatat aggactggag
5041 atgtctgagg ctcattctgc cctcgagccc accgggaacg aaagagaagc tctatctccc
5101 ctccaggagc ccagct-atga actccttctc cacaa-gtaag tgcaggaaat ccttagccct
5161 ggaactgcca gcggcggtcg agccctgtgt gagggagggg tgtgtggccc agggagggct
5221 ggcgggcggc cagcagcaga ggcaggctcc cagctgtgct gtcagctcac cctgcgctc
```

Figura 1 – Sequência do gene da IL-6 estudada. Sequência retirada da base de dados NG_011640.1 GI:225543208 (Homo sapiens interleukin 6 (IL6), RefSeqGene on chromosome 7). Localiza-se o polimorfismo e os primers (a azul). Assinala-se o polimorfismo rs1800796 (-572G/C), a vermelho, 1º exão, a castanho e o 1º codão, na posição 5117, a amarelo.

Em cada amplificação foi utilizado um volume final de 25µl, incluindo 150 ng de ADN, MgCl₂ a 1.5 mM, dNTPs a 200 µM, 0.5µl de cada um dos *primers* – *forward* e *reverse* – a 10µM, tampão 1x (Qiagen, Hilden, Germany) e 0.2µl de *Taq DNA* polimerase (Qiagen, Hilden, Germany).

Depois de uma desnaturação inicial de 5 min a 95°C, seguiram-se 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, destinados à desnaturação do DNA, 30 segundos de *annealing* (ver Tabela 4) e 30

segundos de extensão a 55°C; seguindo-se uma extensão final a 55°C por 5 minutos. O processo realizou-se no termociclador “*My cycler*” (Biorad).

De forma a verificar a qualidade de amplificação, nomeadamente a intensidade de sinal e especificidade, e a ausência de contaminação, procedeu-se à eletroforese em gel de agarose a 3%. Este foi preparado com 4µl de brometo de etídeo e 2,25mg de agarose para um volume final de 75ml. Para a corrida, após a solidificação do gel, foram aplicados 5µl de produto de PCR, 1µl de *loading buffer* tipo IV e 1µl de marcador de peso molecular HiperLadder™ II (Invitrogen,CA,USA). Em cada amplificação usou-se um controlo de contaminação, sem amostra de DNA.

O segmento amplificado foi posteriormente sequenciado de modo a identificar o polimorfismo -597G/A (rs1800797) do gene da IL6.

Tabela 4 – Sequências de *primers* e temperatura de *annealing* utilizadas na amplificação.

Gene	Primers	Temp. de annealing
<i>IL-6</i>	F: 5'- GGAGACGCCTTGAAGTAACTGC - 3' R: 5'- AGTTTCCTCTGACTCCATCGCAG - 3'	55 °C

Legenda: F – *Forward*; R – *Reverse*. Recorreu-se aos mesmos *primers* e temperaturas de *annealing* tanto para a primeira PCR como para a sequenciação.

Sequenciação do produto de PCR

O método aplicado foi o de sequenciação de Sanger, com preparação de amostras em três etapas: purificação inicial do produto de PCR, reação de sequenciação e purificação final.

O produto de PCR foi purificado com recurso ao kit *JetQuick* (Genomed). Acrescentaram-se 400µl da solução H1 por cada 100µl da amostra, aplicando-se posteriormente a mistura à coluna previamente colocada num microtubo de 1,5ml. Centrifugou-se, de seguida, a 12.000 x g durante 1min. Após adicionar 500µl da solução H2, efetuou-se duas vezes a centrifugação. O passo seguinte consistiu em transferir a coluna para um outro microtubo de 1,5ml, adicionar 30µl de água destilada e esterilizada diretamente no centro da malha de sílica, e centrifugar a 12.000 x g durante 2 minutos.

A reação de sequenciação foi preparada com recurso a 13µl de H₂O, 2µl de tampão (Applied Biosystems, CA, USA), 2µl de terminadores (*BigDye Terminator v1.1*, Applied Biosystems, CA, USA), 2µl do *primer reverse* a 10µM – idêntico ao da primeira amplificação, e 1µl do produto de PCR purificado. Realizou-se num termociclador *MyCycler* (Bio-Rad), com 1min a 96°C e 25 ciclos de 10s a 96°C, 5s a 55°C e 4min a 55°C.

Efetuuou-se, de seguida, a purificação do produto resultante da sequenciação através da sua aplicação numa coluna de resina *Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade* (GE Healthcare, Sweden), seguida de centrifugação a 6.000 x g durante 1 minuto.

Posteriormente, aplicou-se uma mistura composta por 5µl da amostra purificada e 12µl de formamida *Hi-Di™* (Applied Biosystems) numa placa de sequenciação, sendo a eletroforese capilar realizada num sequenciador automático *ABI PRISM 3130* (Applied Biosystems and Hitachi). A análise dos resultados foi efetuada com o *software Sequencing Analysis v5.2* (Applied Biosystems, CA. USA), exemplificada na figura 2.

Análise estatística

Recorreu-se ao *software* Excel 2016 (Microsoft Corporation) para processamento dos dados obtidos e ao *IBM SPSS Statistics – Version 19* (SPSS, Inc., IBM Company) para a sua posterior análise estatística. Utilizaram-se os testes de χ^2 e *odds ratio*, considerando-se como estatisticamente significativo um valor de $p < 0.05$.

rs1800797 [*Homo sapiens*]

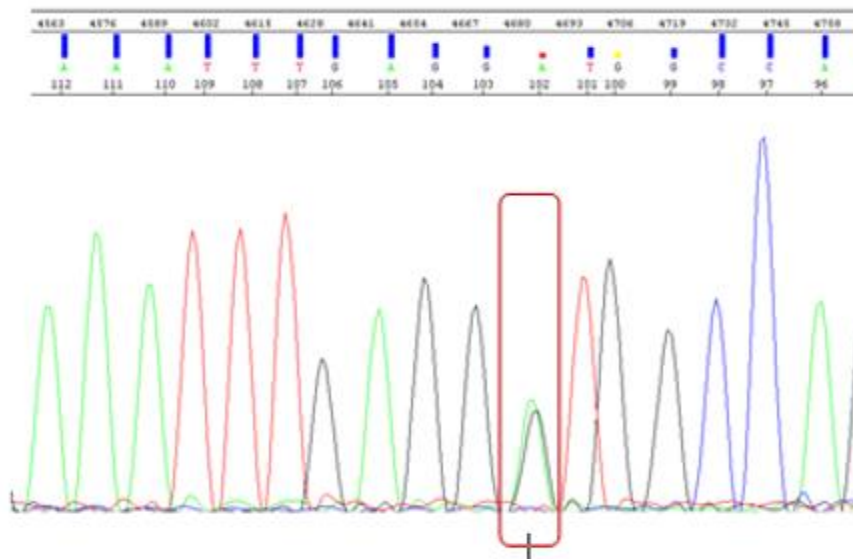
1.

TGAAGTAACTGCACGAAATTTGAGG [A/G] TGGCCAGGCAGTTCTACAACAGCCG

Chromosome: 7:22726602

Gene: IL6 (GeneView) LOC541472 (GeneView)

A



B

Figura 2 – Posição relativa do SNP rs1800797 e eletroforograma de sequencição do segmento amplificado do gene *IL-6*. A – Sequência onde se insere o SNP rs1800797, como vem descrita na base de dados SNP (*print screen* da dbSNP); B – Eletroforograma de sequencição do segmento amplificado do gene da *IL-6* estando assinalado o ponto de heterozigotia que identifica um heterozigoto AG.

Resultados

IL-6 -597G/A (rs1800797)

Os 157 indivíduos estudados incluíram 62 que desenvolveram hepatotoxicidade de algum grau. Para os efeitos de análise estatística e tendo em consideração a dimensão da população, os doentes foram agrupados segundo a ausência (grau 0) ou presença (graus 1 a 3) de hepatotoxicidade.

A tabela 5 ilustra a distribuição de casos com e sem hepatotoxicidade em função dos genótipos do polimorfismo IL-6 -597G/A (rs1800797).

Tabela 5 – Hepatotoxicidade em função dos genótipos observados.

Genótipo	Hepatotoxicidade		Total	P	OR (95% IC)	
	Ausente	Presente				
AA + AG	N	49	44	93	0.016	2.29 (1.16 – 4.53)
	%	52,7%	47,3%	100,0%		
GG	N	46	18	64		
	%	71,9%	28,1%	100,0%		
Total	N	95	62	157		
	%	60,5%	39,5%	100,0%		

N – Número; OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de confiança

Na amostra da população estudada, a frequência do alelo A foi de 0.334 e a do alelo G – 0.666. A frequência genotípica, por sua vez, tem a seguinte distribuição: genótipo AA – 7.64%, AG – 51.59%, GG – 40.76%. Confirmou-se que a população estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P = 0,12$).

Os resultados sugerem que os genótipos com um alelo A (adenina) do gene da IL-6, homocigotos ou heterocigotos, têm um risco aumentado de hepatotoxicidade induzida pela INH comparativamente aos indivíduos homocigotos para o alelo G (guanina) (OR – 2.29 IC 95%; $P = 0.016$). Considerou-se como estatisticamente significativo um valor de $p < 0.05$.

IL-6 -572G/C (rs1800796)

No decurso do trabalho, foi ainda encontrado um achado da sequenciação na forma de polimorfismo IL-6 -572G/C. A sua variabilidade foi, no entanto, muito reduzida.

Discussão

Os resultados sugerem que o gene da IL-6 é um gene de suscetibilidade para a hepatite tóxica induzida pela INH, sendo o alelo A a variante de risco.

Sabe-se atualmente que a IL-6, uma citocina pleiotrópica com efeito em diferentes células, é produzida localmente nos tecidos e libertada em situações de perturbação da homeostase, nomeadamente em casos de endotoxémia, trauma ou infeção aguda. Ao mesmo tempo, a IL-6, tal como o TNF- α e a IL-1, é essencial no processo de indução de resposta imune sistémica ao desencadear febre, elevar níveis de corticosteroides e estimular a produção hepática de proteínas de fase aguda, sobretudo inibidores de proteases. Intervém, também, na diferenciação e maturação dos linfócitos B e T, bem como na dos mieloblastos, megacariócitos, osteoclastos e hepatócitos. Dependendo das características do microambiente em que se encontra, a IL-6 tem capacidade para modular os mecanismos de proliferação e apoptose celular. Em modelos animais submetidos a hepatectomia parcial, a elevação dos níveis da IL-6 foi associada à transição de fase celular G0/G1 observada nos hepatócitos. Esta hipótese foi reforçada pelo facto de ratos *knocked-out* para a IL-6 terem demonstrado uma resposta regenerativa inadequada, com posterior falência orgânica, enquanto que a administração prévia de IL-6 exógena, permitiu normalizar a proliferação celular e evitar os consequentes danos hepáticos.(18) Outros estudos desenvolvidos nesta área demonstraram que esses animais respondem igualmente mal a estímulos químicos, nomeadamente substâncias citotóxicas, comparativamente aos ratos com IL-6.(17) Estas experiências evidenciam um importante papel da IL-6 na resposta hepática à agressão.

Por sua vez, os polimorfismos situados na região promotora do gene da IL-6 (Fig. 3) têm sido associados a algumas patologias, como por exemplo formas mais severas de osteoartrite interfalângica distal ou risco acrescido de cancro colo-retal, sugerindo a sua influência na regulação da expressão da interleucina.(20,23,24)

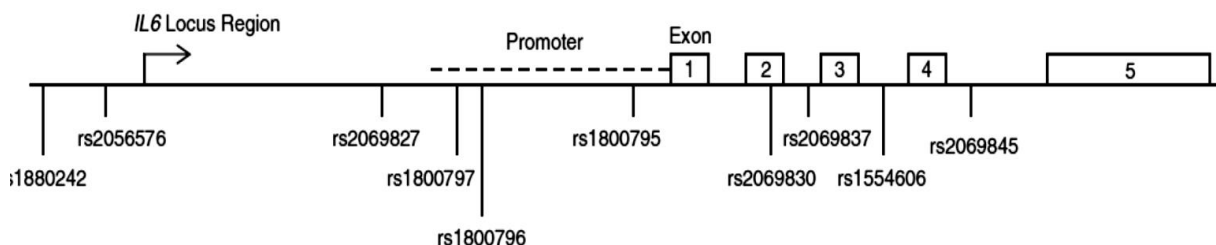


Figura 3 – Polimorfismos do gene *IL-6*

Fonte: *Interleukin-6 haplotypes and the response to therapy of chronic hepatitis C virus infection.*

A própria Isoniazida apresenta características imunogénicas, pois existem casos descritos de lúpus eritematoso por ela induzido.(25) Em até 20% dos doentes expostos à ação do fármaco por um período superior a 6 meses ocorre formação dos anticorpos anti-nucleares. As manifestações mais frequentes dessa forma de lúpus incluem, entre outras, artralgias, anemia, febre, pleurite e pericardite.(26). A hipótese de que a hepatotoxicidade induzida pela INH seja devida a um efeito imunológico direto e não apenas a toxicidade de metabolitos do fármaco, tem vindo a acumular evidências.(27)

Realça-se ainda que para além do SNP rs1800797 (-597G/A) abordado no âmbito deste trabalho, o fenótipo de acetiladores lentos decorrente de polimorfismos do gene *NAT2*, a variante *missense* V444A (rs2287622) do gene *ABCB11*, polimorfismos de outros genes(11,13), e diferentes fatores clínicos, nomeadamente idade avançada, elevada ingestão de álcool, antecedentes de hepatites virais e tuberculose pulmonar extensa, têm sido associados ao aumento do risco de hepatotoxicidade.(28,29)

O conhecimento de marcadores farmacogenéticos abre o caminho para formas mais personalizadas de tratamento, permitindo escolher fármacos mais adequados, de acordo com variantes dos alvos terapêuticos, e ajustar a sua posologia, dependendo de variantes de genes de metabolismo dos fármacos, com vantagens ao nível da eficácia medicamentosa e da prevenção ou redução das possíveis reações adversas. No caso do SNP IL-6 -597G/A (rs1800797), os genótipos homocigóticos ou heterocigóticos para o alelo A podem constituir uma indicação para uma mais apertada vigilância clínica e dos marcadores séricos de lesão hepática, e pela opção por uma dosagem de INH o mais baixa possível.

A redução dos episódios de toxicidade traduz-se numa melhor adesão à terapêutica e menor taxa de abandono do plano estabelecido. O tratamento personalizado é igualmente benéfico na prevenção e combate das formas resistentes e multirresistentes do bacilo *M. tuberculosis* – cada vez mais frequentes. Realça-se que a tuberculose, pela sua elevada morbidade, mortalidade e reincidência, continua a ser um problema de saúde pública e individual.

Conclusão

Os resultados deste estudo sugerem que o SNP *IL-6* -597G/A (rs1800797) é uma variante de suscetibilidade à hepatite tóxica induzida pela Isoniazida.

Há necessidade de confirmar este achado numa amostra de população mais numerosa e de esclarecer o efeito funcional do SNP na regulação da expressão do gene. Seria igualmente interessante averiguar se o risco de hepatotoxicidade nos indivíduos portadores da variante rs1800797 é transversal a outros fármacos e verificar o efeito de os outros SNPs situados na região promotora do gene *IL-6*, como o rs1800795 e o rs1800796.

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva, pelo apoio incansável e imensa dedicação – pilares essenciais deste trabalho.

Ao meu coorientador Professor Doutor Fernando Regateiro, pela simpatia e constante incentivo à evolução pessoal, académica e profissional.

Ao Dr Luís Mesquita, pela disponibilidade demonstrada e valioso contributo para a realização do presente estudo.

À Dr^a Celeste Alcobia e Dr Miguel Villar, por terem disponibilizado as amostras dos doentes e pela sua perspetiva clínica.

Bibliografia

1. WHO WHO. Global Tuberculosis Report. 2015.
2. Zumla AI, Gillespie SH, Hoelscher M, Philips PPJ, Cole ST, Abubakar I, et al. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: Needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis*. Elsevier Ltd; 2014;14(4):327–40.
3. WHO, The World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines. 2010;160.
4. WHO. WHO | Guidelines on the management of latent tuberculosis infection. 2015;38.
5. Lawrence Flick Memorial Tuberculosis Clinic. Guidelines for the Management of Adverse Drug Effects of Antimycobacterial Agents. 1998;(November):1–60.
6. Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb J a., Nolan CM, et al. An official ATS statement: Hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(8):935–52.
7. Matos L, Martins B. Hepatites tóxicas: revisão da literatura. *Med Interna (Bucur)*. 2005;12(4):239–58.
8. Miller EA, Ernst JD. Anti-TNF immunotherapy and tuberculosis reactivation: Another mechanism revealed. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1079–82.
9. Baer-Dubowska W, Majchrzak-Celińska A, Cichocki M. Pharmacogenetics: A new approach to predicting individual drug responses and targeting new drugs. *Pharmacol Reports*. 2011;63(2):293–304.
10. Azuma J, Ohno M, Kubota R, Yokota S, Nagai T, Tsuyuguchi K, et al. NAT2 genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure in the 6-month four-drug standard treatment of tuberculosis: A randomized controlled trial for pharmacogenetics-based therapy. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013;69(5):1091–101.
11. Meier Y, Zodan T, Lang C, Zimmermann R, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, et al. Increased susceptibility for intrahepatic cholestasis of pregnancy and contraceptive-induced cholestasis in carriers of the 1331T>C polymorphism in the bile salt export pump. *World J Gastroenterol*. 2008;14(1):38–45.
12. Kapgate SM, Patil AB. Integrative Approach in Management of Antitubercular drug

- Induced hepatotoxicity. 2015;(1).
13. Carvalho MTPM de. Polimorfismos nos genes NAT2, CYP2E1, GSTT1, GSTM1, ABCB11 e hepatotoxicidade induzida pela Isoniazida. FCTUC Ciências da Vida - Teses de Mestrado. 2012.
 14. Kishimoto T. IL-6: From its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 2010;22(5):347–52.
 15. Okada M, Kita Y, Kanamaru N, Hashimoto S, Uchiyama Y, Mihara M, et al. Anti-IL-6 receptor antibody causes less promotion of tuberculosis infection than Anti-TNF- α antibody in mice. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011.
 16. Kovalovich K, DeAngelis R a, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub R. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology.* 2000;31(1):149–59.
 17. Jin X, Zimmers T a, Perez E a, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG. Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology.* 2006;43(3):474–84.
 18. Streetz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut.* 2000;47(2):309–12.
 19. Martinez AN, Mehra S, Kaushal D. Role of interleukin 6 in innate immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Infect Dis.* 2013;207(8):1253–61.
 20. Yee LJ, Im K, Borg B, Yang H, Liang TJ. Interleukin-6 haplotypes and the response to therapy of chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun.* 2009;10:365–72.
 21. Gao SP, Liang S, Pan M, Sun RL, Chen C, Luan H, et al. Interleukin-6 genotypes and serum levels in Chinese Hui population. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(9):2851–7.
 22. Ferrari SL, Ahn-Luong L, Garnerio P, Humphries SE, Greenspan SL. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):255–9.
 23. Kämäräinen O-P, Solovieva S, Vehmas T, Luoma K, Riihimäki H, Ala-Kokko L, et al. Common interleukin-6 promoter variants associate with the more severe forms of distal

- interphalangeal osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(1):R21.
24. Curtin K, Wolff RK, Herrick JS, Abo R, Slattery ML. Exploring multilocus associations of inflammation genes and colorectal cancer risk using hapConstructor. *BMC Med Genet.* BioMed Central Ltd; 2010;11(1):170.
 25. Metushi I, Uetrecht J, Phillips E. Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now. *Br J Clin Pharmacol.* 2016;Jan 15.
 26. Nourbakhsh B, Stüve O. Isoniazid in autoimmunity: a trigger for multiple sclerosis? *Ther Adv Neurol Disord.* 2014;7(5):253–6.
 27. Perwitasari DA, Atthobari J, Wilffert B. Pharmacogenetics of isoniazid-induced hepatotoxicity. *DRUG Metab Rev.* 2015;47(2):222–8.
 28. Pande JN, Singh SP, Khilnani GC, Khilnani S, Tandon RK. Risk factors for hepatotoxicity from antituberculosis drugs: a case-control study. *Thorax.* 1996;51(2):132–6.
 29. Babalık A, Arda H, Bakırcı N, Ağca S, Oruç K, Kızıldağ S, et al. Management of and risk factors related to hepatotoxicity during tuberculosis treatment. *Tuberk Toraks.* 2012;60(2):136–44.