

UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA

LINEKER ALBERTO ARAÚJO FROTA

**QUAL É A ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO *IL6*
-174 G>C (RS1800795) E O RISCO DE DENGUE? EVIDÊNCIA
DE UMA METANÁLISE.**

PARNAÍBA - PI
2021

LINEKER ALBERTO ARAÚJO FROTA

**QUAL É A ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO *IL6*
-174 G>C (RS1800795) E O RISCO DE DENGUE? EVIDÊNCIA
DE UMA METANÁLISE.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
como requisito para aprovação em TCC III.

Orientadora: Prof.^a Dra. Anna Carolina Toledo
da Cunha Pereira

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba

Frota, Lineker Alberto Araújo.

Qual é a associação entre o polimorfismo *IL6* -174 G>C (rs1800795) e o risco de dengue? Evidência de uma metanálise. / Lineker Alberto Araújo Frota. – 2021.

47f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) apresentado à Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Parnaíba, 2021.

Orientação: Prof.^a Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira.

Área de concentração: Medicina investigativa e Marcadores epidemiológicos.

1. Arbovírus. 2. Polimorfismo. 3. Citocina. 4. Suscetibilidade a doenças.
I. Pereira, Anna Carolina Toledo da Cunha. II. Título

LINEKER ALBERTO ARAÚJO FROTA

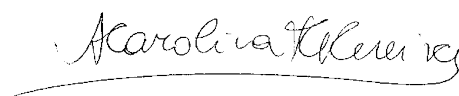
**QUAL É A ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO *IL6*
-174 G>C (RS1800795) E O RISCO DE DENGUE? EVIDÊNCIA
DE UMA METANÁLISE.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
como requisito para aprovação em TCC III.

Orientadora: Prof.^a Dra. Anna Carolina Toledo
da Cunha Pereira

Aprovado em 28 de maio de 2021

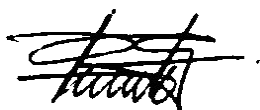
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira (Orientadora)
Curso de Biomedicina – UFDPAR



Prof. Dr. Fábio José Nascimento Motta (Examinador)
Curso de Biomedicina – UFDPAR



Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto (Examinador)
Curso de Biomedicina – UFDPAR

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, por nunca ter medido esforços para me proporcionar a melhor educação, por sempre me incentivar a seguir meus sonhos, por compartilhar os momentos de alegria, por sempre me alavancar nos momentos de tristeza, pelo companheirismo, pela cumplicidade e pelo apoio em todos os momentos delicados da minha vida.

Dedico a ti, Senhor, toda honra e toda glória, pois da mesma forma que uma folha não cai ao chão sem a tua permissão, eu não teria conquistado essa vitória se o Senhor não tivesse permitido. Louvado e glorificado seja o Teu nome para todo o sempre, amém!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Trindade Divina (Pai, Filho e Espírito Santo), pela minha vida e pela vida de todos que de alguma forma contribuíram, e que ainda contribuirão, para minha formação pessoal e profissional. Agradeço a Deus pela criação de todas as maravilhas da vida, pela oportunidade de estudar, pela saúde dada, assim como por todas as dificuldades, pois elas nos amadurecem e nos fortificam. Obrigado, Pai, por tudo. Obrigado, Cristo, por ter nos salvado. Obrigado, Espírito Santo, por sempre estar conosco.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira, que dirigiu este trabalho com dedicação, paciência e seriedade, sempre disponível a compartilhar todo o seu vasto conhecimento. A realização desse trabalho não seria possível sem o seu imensurável apoio. Para sempre levarei seus ensinamentos. Grato por você ter feito parte dessa etapa da minha vida.

Agradeço à minha colega biomédica MSc. Naiany Carvalho Santos, aos professores e doutores Felipe Rodolfo Pereira da Silva e Gustavo Portela Ferreira pelos ensinamentos, pela paciência, pela dedicação e pelo auxílio para que este trabalho pudesse ser concluído.

Agradecer aos professores e doutores Fábio José Nascimento Motta e Giovanny Rebouças Pinto pelo conhecimento repassado a mim, pelo acolhimento e acompanhamento na caminhada acadêmica e pela amizade.

Muito grato a todos, vocês foram essenciais para essa conquista.

RESUMO

A associação de polimorfismos em genes responsáveis por mediadores imunológicos com a dengue permite a identificação de determinadas alterações genéticas que aumentam ou diminuem o risco de desenvolvimento da doença. Há na literatura alguns estudos que correlacionaram o polimorfismo no gene da interleucina 6 na posição -174 G>C (*IL6* -174 G>C) (rs1800795) com a dengue. No entanto, há uma inconsistência na influência desse polimorfismo na doença, a qual motivou esta metanálise. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar se o polimorfismo rs1800795 está relacionado com a proteção ou suscetibilidade para o desenvolvimento da dengue. Foram realizadas buscas em várias bases de dados por estudos publicados antes de 05 de setembro de 2020. Cálculos do Odds Ratio (OR) com 95% de Intervalos de Confiança (IC) e da heterogeneidade (I^2) foram avaliados, e o viés de publicação foi verificado pelo teste de Begg e Egger. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Como resultados, cinco estudos de caso-controle foram identificados e incluídos nos resultados. A análise mostrou que o genótipo heterozigoto tem papel protetor contra dengue sem sinais de alarme (DSSA) (OR = 0,57, $p = 0,001$), assim como o alelo polimórfico C (OR = 0,77, $p = 0,04$). Ao unificar os dados dos estudos inclusos, o genótipo GG foi mais prevalente entre os indivíduos com dengue com sinais de alarme (DCSA) quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0221$). O genótipo GC foi mais prevalente no grupo controle do que no grupo DCSA ($p = 0,0119$). Portanto, em nosso estudo observamos que o genótipo GC e o alelo C têm um papel protetor contra DSSA. Como esse polimorfismo está associado à baixa expressão de IL-6, sugere-se uma diminuição da resposta pró-inflamatória. Porém, mais estudos sobre essa temática são necessários para um consenso acerca da relação desse polimorfismo e a dengue.

Palavras-chave: Arbovírus. Polimorfismo. Citocina. Suscetibilidade a doenças

ABSTRACT

The association of polymorphisms in genes responsible for immunological mediators with dengue allows the identification of certain genetic alterations that increase or decrease the development risk of the disease. A few number of studies that correlate the interleukin 6 -174 G>C (*IL6* -174 G>C) polymorphism (rs1800795) with dengue. However, there is an inconsistency on the polymorphism influence on the disease which motivated this meta-analysis. So, this study aimed to evaluate the rs1800795 polymorphism with protection or susceptibility for development of dengue. A search of the literature was performed for studies published before 05 September 2020 in various databases. Calculations of Odds Ratio (OR) with 95% of Confidence Intervals (CI) and heterogeneity (I^2) were assessed and publication bias was done by Begg' and Egger's test. The value of $p < 0.05$ was considered as significant. As results, five case-control studies were identified and included in the results. The analysis showed that the heterozygous genotype has a protective role against dengue without warning signs (DWOS) (OR = 0.57, $p = 0.001$), as well as the polymorphic C allele (OR = 0.77, $p = 0.04$). When unifying the data from the included studies, the GG genotype was more prevalent among individuals with dengue with warning signs (DWWS) when compared to the control group ($p = 0.0221$). GC genotype was more prevalent in the control group than in the DWWS group ($p = 0.0119$). Therefore, in our study we observed that the GC genotype and the C allele have a protective role against DWOS. Since this polymorphism is associated with low IL-6 expression, thus it is expected that there will be a decreased pro-inflammatory response. However, more studies regarding this thematic are necessary to have a consensus about this polymorphism and dengue.

Keywords: Arboviruses. Polymorphism. Cytokine. Disease susceptibility.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos na associação entre o SNP IL6 -174 G/C e a dengue.....	18
Tabela 2 - Distribuição da frequência alélica e genotípica dos estudos inclusos	19
Tabela 3 - Significância estatística das análises das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos com base no teste do qui-quadrado (χ^2).....	19
Tabela 4 - Associação do polimorfismo IL6 -174 G>C com a dengue entre o grupo DSSA e o grupo Controle.....	20
Tabela 5 - Associação do polimorfismo IL6 -174 G>C com a dengue entre o grupo DCSA e o grupo Controle.....	21
Tabela 6 - Associação do polimorfismo IL6 -174 G>C com a dengue entre o grupo DCSA e o grupo DSSA.....	22
Tabela 7 - Valores do teste de regressão linear de Egger e teste de Begg para detecção de viés de publicação nas comparações entre o grupo DSSA e o grupo Controle	22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 METODOLOGIA.....	14
3.1 Protocolo.....	14
3.2 Critérios de elegibilidade.....	14
3.3 Estratégia de busca	15
3.4 Extração de dados.....	15
3.5 Avaliação do risco de viés	15
3.6 Análise estatística	15
4 RESULTADOS	17
5 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS	28
APÊNDICE A – <i>Forest plot</i> da comparação entre os grupos DSSA e Controle	33
APÊNDICE B – <i>Forest plot</i> da comparação entre os grupos DCSA e Controle	35
APÊNDICE C – <i>Forest plot</i> da comparação entre os grupos DCSA e DSSA.....	36
APÊNDICE D – <i>Funnel plot</i> da comparação entre os grupos DSSA e Controle	37
ANEXO 1 – Publicação do artigo	38

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença viral sistêmica transmitida ao homem por meio da picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *albopictus*. Como o *Dengue virus* (DENV) não apresenta grande diversidade de hospedeiros, o ciclo humano-mosquito continua sendo o principal meio de transmissão. O DENV pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, possui RNA de fita simples de sentido positivo e apresenta quatro sorotipos distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (CHEN et al., 2015; WARKENTIEN; PAVLICEK, 2016).

O DENV é um vírus esférico com um diâmetro aproximado de 50nm e seu genoma possui aproximadamente 11kb de comprimento. No RNA, na extremidade 5' há um *-cap* do tipo I (m⁷GpppAmp), não possui cauda poliadenilada na extremidade 3' e o produto de seu genoma é uma única poliproteína (BEGUM et al., 2019; DUAN et al., 2019). Essa poliproteína é clivada pós-traducionalmente em dez proteínas, sendo três proteínas estruturais – proteína C referente ao capsídeo, proteína prM/M referente à pré-membrana/membrana e a proteína E relaciona ao envelope – e sete proteínas não estruturais – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (WANG; ZHANG, 2017).

O desmatamento, o desenvolvimento de assentamentos e a evolução de centros humanos foram alguns fatores que favoreceram para que o *Dengue virus* passasse do ciclo silvestre para o urbano e assim passasse a ter uma maior interação com os humanos (GUBLER, 2006). A existência de vetores domésticos, *Aedes aegypti*, e peridomésticos, *Aedes albopictus*, facilitaram essa interação disseminando a doença, o primeiro originário da África e o segundo oriundo da Ásia (GUBLER, 1998; WARKENTIEN; PAVLICEK, 2016).

A segunda guerra mundial foi um acontecimento histórico determinante para a expansão da doença devido à grande movimentação de tropas para o sudeste da Ásia e para Ilhas do Pacífico (WARKENTIEN; PAVLICEK, 2016). A migração humana através de navios, como a migração de escravos da África para a América, foi um outro grande fator que contribuiu para que a doença se espalhasse e chegasse a uma escala global. Vale ressaltar que a utilização da aviação favorece para que os vírus cheguem a lugares mais longes e mais rápido do que antes, quando se utilizava, principalmente, a navegação (HALSTEAD, 2019).

A doença teve epidemiologia considerável, atingindo uma densidade de incidência de 8,94 por 100 pessoas no período de 2014 a 2018 no Brasil (LUNA et al., 2020) e uma soroprevalência de 35,9% para anticorpos IgG entre mulheres grávidas da República Democrática de São Tomé e Príncipe (YEN et al., 2016). Além disso, uma alta porcentagem de IgG foi identificada em indivíduos com 15–24 anos (36%) em Delhi na Índia (VIKRAM et al.,

2016) e um aumento da prevalência de dengue foi observado em pacientes da cidade de São José do Rio Preto, Brasil, em que os autores analisaram 1549 amostras e encontraram 1389 amostras positivas para dengue pelo teste rápido NS1 (COLOMBO et al., 2016).

No Brasil, no ano de 2020, foram notificados 987.173 casos prováveis de dengue, com uma incidência de 469,8 casos/100mil habitantes (hab). Sendo que teve 826 casos confirmados para dengue grave e 9.072 para dengue com sinais de alarme. Ademais, nesse mesmo ano foram confirmados 554 óbitos por dengue. A região Centro-Oeste foi a que apresentou uma maior incidência de casos de dengue (1.212,1 casos/100mil hab), seguida da região Sul (940,0 casos/100mil hab), sendo a região Norte do Brasil a que houve uma menor incidência (119,5 casos/100mil hab). No Nordeste, o número de casos notificados prováveis foi de 150.566 com uma taxa de incidência de 263,8 casos/100mil hab (BRASIL, 2021).

Um novo protocolo desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2009 trouxe uma nova classificação para a doença. Desde 2014, o Brasil utiliza essa nova classificação, definindo a dengue como uma doença única, dinâmica e sistêmica, assim a infecção pelo DENV pode regredir ou evoluir no hospedeiro. Anteriormente, segundo critérios estabelecidos pela OMS em 1997, a dengue era classificada em febre da dengue (FD), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD), porém com a nova classificação passa a ser classificada como dengue sem sinais de alarme (DSSA), dengue com sinais de alarme (DCSA) e dengue grave (DG). Essa forma de distinção permite melhor atendimento aos pacientes de acordo com os sintomas relacionados à doença (BRASIL, 2013; BRASIL, 2016; BRASIL, 2017; WHO, 1997; WHO, 2009).

O diagnóstico precoce para a dengue é de suma importância para submeter o indivíduo um tratamento adequado visando a melhora dos sintomas clínicos (GAO et al., 2019). Um indivíduo com suspeita de dengue pode ser diagnosticado com a doença através de sinais e sintomas clínicos e confirmando o diagnóstico por diversos métodos, sendo os mais utilizados os testes que empregam a detecção de anticorpos anti-DENV – imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) – e de antígenos, como a NS1, e testes que promovem a amplificação molecular de ácido nucleico do DENV por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (KYAW et al., 2019; RAAFAT; BLACKSELL; MAUDE, 2019).

Para resultados mais fidedignos, recomenda-se a utilização dos testes sorológicos para IgM e IgG específicos juntamente com testes que detectam o antígeno NS1, evitando falso-positivos (CHONG et al., 2019; KYAW et al., 2019). Vale ressaltar que a proteína NS1 é secretada pela célula infectada desde o início dos sintomas até o nono dia de infecção, sendo

encontrada em grande concentração no sangue, e essa concentração está diretamente associada com a carga viral (CHONG et al., 2019; LIMA et al., 2019; TAN et al., 2020).

A progressão da doença para as formas mais graves ocorre com risco aumentado em indivíduos expostos a uma infecção secundária ou consecutiva por um sorotipo diferente (CHEN et al., 2015). Os mecanismos imunopatológicos que contribuem para o estabelecimento da dengue compreendem uma complexa cadeia de respostas imunológicas (KURANE, 2007). Citocinas e mediadores químicos, por exemplo, estão envolvidos em processos patológicos que podem se correlacionar com a gravidade da doença. A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina que está associada ao processo patológico da dengue, por isso tem sido alvo de estudos que buscam elucidar a patogênese da doença (AVENDAÑO-TAMAYO et al., 2017; DETTOGNI et al., 2015; IANI et al., 2016; PATRA et al., 2019; PATRO et al., 2019).

A produção de IL-6 inicia-se no decorrer da fase aguda do processo inflamatório. Essa citocina promove a diferenciação dos monócitos em macrófagos e impede a infiltração de neutrófilos. Além disso, a IL-6 promove a liberação de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que ao induzir a angiogênese irá gerar fendas intercelulares, vacúolos e fenestrações, ocasionando um aumento da permeabilidade vascular, uma das características da DCSA (BATES et al., 2002; PARK et al., 2019; SCHETT, 2018).

Existem vários estudos que associam polimorfismos genéticos a diferentes doenças. Polimorfismos em genes responsáveis por mediadores imunológicos podem determinar se indivíduos positivos para essas variações genéticas são mais suscetíveis ou desenvolvem alguma proteção contra a doença (GUPTA et al., 2018). Um exemplo dessas variações genéticas é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene *IL6* na posição -174 G>C (rs1800795), onde ocorre a troca de uma guanina por uma citosina, que modifica a expressão gênica e resulta em alterações plasmáticas de IL-6, assim havendo uma possível influência no curso clínico da dengue (AVENDAÑO-TAMAYO et al., 2017; CANSANÇÃO et al., 2016a; FEITOSA et al., 2016). No entanto, os resultados desses estudos permanecem contraditórios. Ressalta-se que há um consenso de que o alelo polimórfico C está associado à baixa expressão do gene *IL6*, o que resulta na diminuição do nível de IL-6 no plasma (FISHMAN et al., 1998; PIERONI et al., 2007; TETZLAFF et al., 2018).

Estudos com abordagens metanalíticas são considerados o topo da evidência científica para reunir resultados contrários disponíveis na literatura, visto que pesquisas por metanálise para detectar a influência de distintos polimorfismos em genes de citocinas na dengue já foram realizadas anteriormente (PABALAN et al., 2018; SANTOS et al., 2020). Além disso, esse tipo de estudo pode elucidar a associação de alterações genéticas com a dengue, que é o objetivo

das pesquisas atuais, pois através desse conhecimento é possível compreender melhor os mecanismos de patogênese visando desenvolver estratégias de intervenções terapêuticas eficazes para prevenir a evolução da doença para as formas mais graves.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar, por meio de cálculos metanalíticos, a possível relação do SNP *IL6* -174 G>C (rs1800795) com a susceptibilidade ou proteção contra a dengue.

2.2 Objetivos específicos

- Buscar e selecionar os estudos genéticos relacionando o polimorfismo SNP *IL6* -174 G>C (rs1800795) e a dengue publicados até 05 de setembro de 2020.
- Tabular os dados e informações dos estudos eleitos, especialmente os números relacionados à frequência genotípica e alélica;
- Formar grupos comparativos com base no estágio da doença;
- Verificar, mediante softwares estatísticos, as diferenças significativas das frequências genotípicas e alélicas entre os grupos e a existência de viés de publicação entre os estudos;
- Calcular o Odds Ratio associando o SNP rs1800795 com a dengue;
- Relacionar a doença e o polimorfismo com os resultados metanalíticos obtidos;

3 METODOLOGIA

3.1 Protocolo

A metanálise seguiu os critérios propostos por Moher et al. (2009) em *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA).

3.2 Critérios de elegibilidade

Para serem incluídos na metanálise, os estudos deveriam preencher os seguintes critérios: (1) ser um estudo caso-controle original; (2) avaliar a associação entre o SNP *IL6*-174 G>C com a dengue; (3) ter dados sobre a frequência genotípica; (4) ter o diagnóstico dos pacientes dos grupos casos mediante achados clínicos e laboratoriais. O diagnóstico para febre da dengue (FD) consiste em achados clínicos específicos, como febre associada a cefaleia, dor retrorbitária, mialgia, artralgia, erupção cutânea, leucopenia, náusea ou vômito, com confirmação laboratorial por meio de técnicas de isolamento viral ou detecção de antígeno ou anticorpo (WHO, 1997). O diagnóstico dos casos de febre hemorrágica da dengue (FHD) consiste na observação do achado de febre alta ou histórico de febre nos últimos 2 a 7 dias, associada a tendências a sangramento, trombocitopenia, variação do tamanho do fígado em 2 cm - 4 cm, evidências de vazamento de plasma conferido pelo aumento do hematócrito, podendo ser confirmado por testes laboratoriais, como técnicas de isolamento viral e detecção de antígeno ou anticorpo (WHO, 1997). O diagnóstico de dengue sem sinais de alarme (DSSA) é realizado com base em achados como febre associada a duas ou mais manifestações, como náusea, vômito, erupção cutânea, leucopenia e dores, com confirmação laboratorial por meio de técnicas de isolamento viral ou detecção de antígeno ou anticorpo (WHO, 2009). Por fim, o diagnóstico de casos de dengue com sinais de alarme (DCSA) é feito mediante a associação de manifestações clínicas, como dor ou sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, acúmulo de fluidos corporais, sangramento da mucosa, letargia, inquietação, aumento do fígado >2 cm, aumento do hematócrito concomitante com a rápida diminuição na contagem de plaquetas, podendo ser confirmado por testes laboratoriais, como técnicas de isolamento viral e detecção de antígeno ou anticorpo (WHO, 2009). Os artigos que não atendiam a pelo menos um desses critérios foram excluídos.

3.3 Estratégia de busca

A pesquisa bibliográfica foi realizada por duas investigações refinadas em busca de estudos publicados até 05 de setembro de 2020. As bases de dados utilizadas para a recuperação dos estudos foram: Google Scholar, MedLine, PubMed, Scielo, SCOPUS e Web of Science. As palavras-chave utilizadas na busca foram: “dengue”, “polymorphism”, “cytokine”, “interleukin”, “SNP”, “IL6”, “174 G/C” e “rs1800795”, combinando-as com os operadores booleanos “AND” e “OR”. Houve restrição de idioma, sendo incluso o estudo publicado no idioma inglês, e as referências dos estudos identificados e elegíveis foram analisadas para identificar potenciais estudos adicionais.

3.4 Extração de dados

Dois pesquisadores extraíram de forma independente os dados dos estudos incluídos seguindo um formulário padronizado composto por: nome do primeiro autor, ano de publicação, país em que o estudo foi realizado, tamanho da amostra, modelo de controle, número de casos e controle, método de genotipagem do SNP *IL6* -174 G>C, frequência genotípica e alélica.

3.5 Avaliação do risco de viés

Os estudos inclusos foram avaliados pela escala de Newcastle-Ottawa (NOS) (WELLS et al., 2014) para avaliar a qualidade em que os estudos foram analisados nos aspectos metodológicos de seleção, comparabilidade e exposição, recebendo pontuação. Estudos com pontuação <7 foram excluídos.

3.6 Análise estatística

A partir dos dados tabulados, indivíduos saudáveis ou com diagnóstico negativo para infecção por DENV constituíram o grupo Controle, pacientes positivos para dengue sem sinais de alarme integraram o grupo DSSA e pacientes com diagnóstico positivo para dengue com sinais de alarme formaram o grupo DCSA. Na metanálise entre os grupos, houve comparação em três modelos genéticos: modelo alélico (C versus G), homozigoto (CC versus GG), heterozigoto (GC versus GG). Para avaliar a importância do genótipo heterozigoto, o modelo recessivo (CC versus GC + GG) e o modelo dominante (CC + GC versus GG) foram analisados.

A análise estatística foi realizada no *Review Manager* v.5.3 (REVMAN, 2014) para calcular o OR com significância ($p < 0,05$), associando o polimorfismo rs1800795 à suscetibilidade ou à proteção contra a dengue. Na constatação dessa significância, os resultados do teste qui-quadrado (χ^2) foram analisados com base no teste Q para verificar a presença de heterogeneidade (I^2) entre os estudos. Quando as comparações mostraram a presença de heterogeneidade estatisticamente não significativa ($I^2 < 50\%$, $P_{\text{heterogeneidade}} > 0,05$), um modelo de efeito fixo (EF) foi usado para estimar o valor de OR. Nas comparações em que a heterogeneidade foi estatisticamente significativa ($I^2 > 50\%$, $P_{\text{heterogeneidade}} < 0,05$), o modelo de efeito aleatório (ER) foi usado para estimar o valor de OR.

Quando $I^2 > 50\%$, os estudos que causavam heterogeneidade foram excluídos, deixando os estudos analisados menos heterogêneos ($I^2 < 50\%$). O OR foi calculado com intervalo de confiança (IC) a 95%, o qual permite associar o polimorfismo rs1800795 com a proteção ou com a suscetibilidade à dengue. O resultado de todas as comparações é considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

O *BioEstat* 5.3 (BIOESTAT, 2007) foi usado para determinar diferenças significativas na comparação das frequências alélicas e genotípicas. O teste do qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para avaliar a ocorrência dessa significância, considerando uma diferença significativa quando $p < 0,05$.

Para detectar o viés de publicação, os gráficos de *funnel plot* e o teste de Begg e Egger foram analisados por meio do software *Comprehensive-Meta Analysis* v.3 (CMA, 2013).

4 RESULTADOS

A busca sistemática identificou 4.700 artigos e após as etapas de triagem e elegibilidade, quatro estudos (CANSANÇÃO et al., 2016a; FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004; MOREIRA et al., 2008; PEREZ et al., 2010) atenderam os critérios de inclusão e foram incluídos na metanálise. A metanálise foi realizada com dados dos artigos inclusos e com os dados de um estudo adicional de dados internos do nosso grupo de estudo do Laboratório BIOMIC (QUEIROZ et al., 2021) (Figura 1). Os estudos alcançaram mais de 7 pontos na NOS conforme mostra a Tabela 1.

Os estudos incluídos nesta metanálise que não adotaram a classificação clínica estabelecida pela OMS em 2009 (WHO, 2009) para dengue, dividindo seus grupos em FD e FHD de acordo com os critérios da OMS em 1997 (WHO, 1997), tiveram seus dados tabulados como DSSA para indivíduos com diagnóstico de FD e DCSA para indivíduos com diagnóstico de FHD. De acordo com a nova categorização da dengue pela OMS em 2009, a dengue grave (DG) corresponde a casos extremos, que não podem ser confundidos com FHD nesta metanálise.

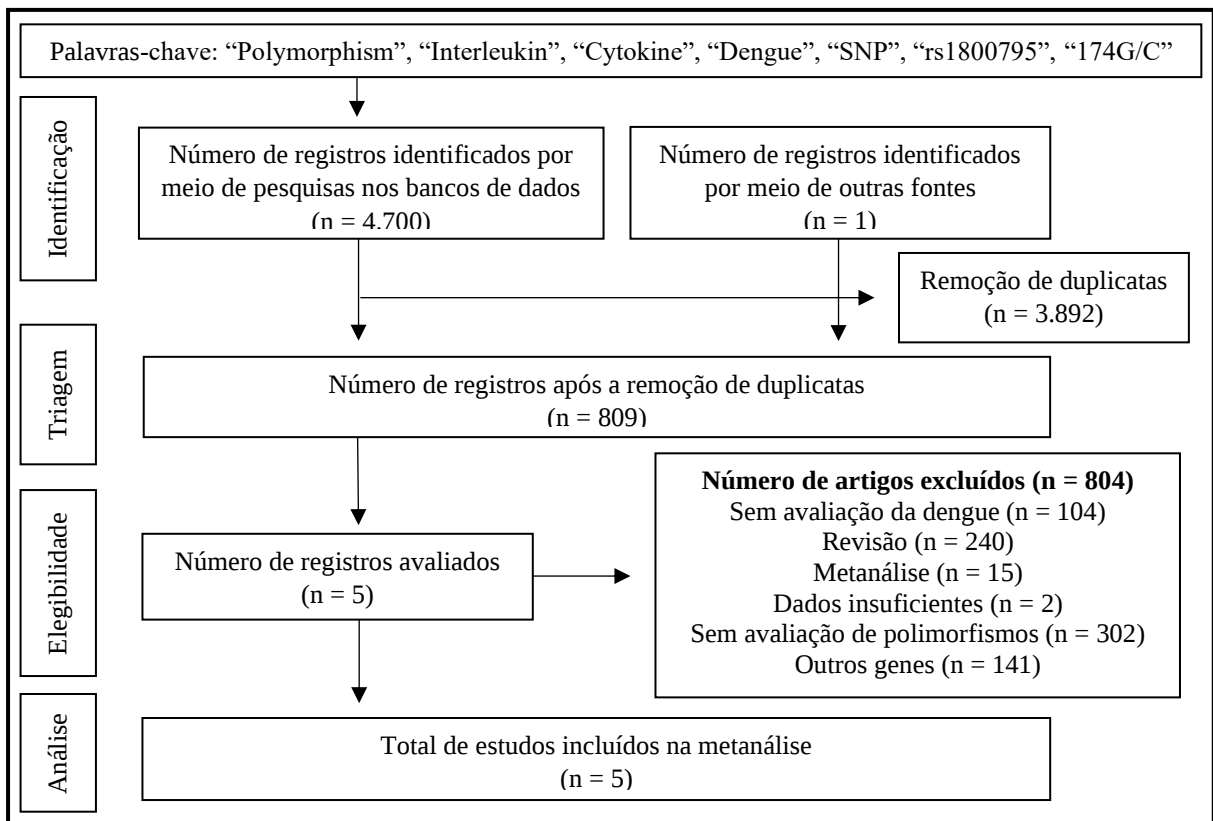


Figura 1 – Diagrama de fluxo da seleção dos estudos para associar SNP rs1800795 com a dengue
Fonte: Autoria própria

A soma dos dados resultou em 605 voluntários que constituíram o grupo controle, 408 pacientes com dengue sem sinais de alarme (DSSA) formando o grupo DSSA e 112 pacientes com dengue com sinais de alarme (DCSA) constituindo o grupo DCSA. Vale ressaltar que nem todos os artigos selecionados para este estudo possuem os três grupos (controle, DSSA e DCSA). O estudo de Cansanção et al. (2016a) e o de Moreira et al. (2008) têm o grupo controle e o grupo DSSA. Perez et al. (2010) realizaram a associação do SNP rs1800795 com a dengue comparando o grupo controle e o grupo DCSA. O estudo de Fernández-Mestre et al. (2004) possui os três grupos possíveis, porém há apenas a frequência genotípica do grupo DSSA e do grupo DCSA devido não ter encontrado resultados significativos com a participação do grupo controle, ocorrendo a comparação somente entre os grupos com infecção por DENV. Por fim, o estudo caso-controle dos presentes pesquisadores, realizado em nosso Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMIC) (QUEIROZ et al., 2021), possui informações referentes aos três grupos (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos estudos incluídos na associação entre o SNP *IL6* -174 G/C e a dengue

Primeiro autor, ano	País	Casos (n)	Controle (n)	MG	NOS
CANSANÇÃO et al., 2016a	Brasil	DSSA (93)	DN (71)	PCR-RFLP	9
PEREZ et al., 2010	Cuba	DCSA (43)	Saudável (92)	PCR-SSP	7
MOREIRA et al., 2008	Brasil	DSSA (201)	N/I (311)	PCR-SSP	8
FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004	Venezuela	DSSA (41) DCSA (25)	Saudável (46)*	PCR-SSP	8
QUEIROZ et al., 2021	Brasil	DSSA (73) DCSA (44)	Saudável (131)	qPCR	8

DSSA: dengue sem sinais de alarme; DCSA: dengue com sinais de alarme; n: número de indivíduos participantes do estudo; DN: pacientes sintomáticos com diagnóstico negativo para dengue; N/I: não informado; *: não incluso na metanálise, dado indisponível; MG: Método de genotipagem; NOS: escala de Newcastle-Ottawa.

Fonte: Autoria própria

A Tabela 2 mostra a distribuição da frequência alélica e genotípica após unificar os dados de todos os artigos participantes deste estudo. A Tabela 3 mostra a análise das frequências genotípicas e alélicas entre os grupos. O teste do qui-quadrado (χ^2) analisou se as frequências apresentavam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos. O genótipo GG foi significativamente mais frequente no grupo DCSA ($p = 0,0221$). O genótipo GC foi mais prevalente no grupo controle ($p = 0,0119$) (Tabela 3).

Tabela 2 - Distribuição da frequência alélica e genotípica dos estudos incluídos

Genótipo/Alelo	Controle N (%)	DSSA N (%)	DCSA N (%)
GG	318 (52.56)	232 (56.86)	72 (64.29)
GC	232 (38.35)	137 (33.58)	29 (25.89)
CC	55 (9.09)	39 (9.56)	11 (9.82)
G	868 (71.74)	601 (73.65)	173 (77.23)
C	342 (28.26)	215 (26.35)	51 (22.77)

N: quantidade de genótipo ou alelo; DSSA: dengue sem sinais de alarme; DCSA: dengue com sinais de alarme.

Fonte: Autoria própria

Tabela 3 - Significância estatística das análises das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos com base no teste do qui-quadrado (χ^2)

Genótipo/Alelo	DSSA vs Controle		DCSA vs Controle		DCSA vs DSSA	
	Frequência (%)	P	Frequência (%)	P	Frequência (%)	P
GG	56.86/52.56	0.1778	64.29/52.56	0.0221*	64.29/56.86	0.1579
GC	33.58/38.35	0.1219	25.89/38.35	0.0119*	25.89/33.58	0.1222
CC	9.56/9.09	0.8012	9.82/9.09	0.8060	9.82/9.56	0.9335
G	73.65/71.74	0.3433	77.23/71.74	0.0902	77.23/73.65	0.2766
C	26.35/28.26	0.3433	22.77/28.26	0.0902	22.77/26.35	0.2766

DSSA: dengue sem sinais de alarme; DCSA: dengue com sinais de alarme; P: valor-p para χ^2 . *: valor-p estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria

Nesta metanálise, avaliamos a associação do SNP *IL6* -174 G>C com a dengue por meio de frequências genotípicas e alélicas envolvendo apenas estudos que continham os mesmos grupos em suas respectivas análises. Assim, ao comparar os genótipos entre o grupo DSSA e o grupo controle, três estudos foram selecionados (CANSANÇÃO et al., 2016a; MOREIRA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2021) devido aos autores compararem o grupo DSSA com o grupo controle em suas análises, totalizando 880 participantes (367 casos e 513 controles). Da mesma forma, na comparação com o grupo DCSA e o grupo controle, dois estudos foram envolvidos (PEREZ et al., 2010; QUEIROZ et al., 2021), com um total de 310 participantes (87 casos e 223 controles). Por fim, na análise com o grupo DCSA e o grupo DSSA, dois estudos foram integrados (FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2004; QUEIROZ et al., 2021), totalizando 183 participantes (69 com DCSA e 114 com DSSA).

Os resultados da metanálise do DSSA versus controle são apresentados na Tabela 4, na qual se observa que, no modelo heterozigoto, o genótipo GC está associado à proteção contra DSSA (OR = 0,57, IC = 0,41 – 0,80, $p = 0,001$, $I^2 = 0\%$, $P_{\text{heterogeneidade}} = 0,39$) (Apêndice A). A análise com o modelo dominante (CC + GC vs. GG) mostrou que ele está associado à proteção

contra DSSA (OR = 0,63, IC = 0,47 – 0,86, $p = 0,004$, $I^2 = 28\%$, $P_{\text{heterogeneidade}} = 0,24$). Além desses resultados, a comparação no modelo alélico mostrou que o alelo polimórfico C está associado à proteção contra DSSA (OR = 0,77, IC = 0,60 – 0,99, $p = 0,04$, $I^2 = 48\%$, $P_{\text{heterogeneidade}} = 0,17$). Porém, no modelo homozigoto (CC vs. GG) e recessivo (CC vs. GG + GC), os OR das associações sugerem que o genótipo homozigoto CC aumenta as chances de o indivíduo ser suscetível a esta doença, mas os resultados não foram significativos (OR = 1,12, IC = 0,69 – 1,81, $p = 0,65$, $I^2 = 27\%$, $P_{\text{heterogeneidade}} = 0,25$) e (OR = 1,26, IC = 0,78 – 2,02, $p = 0,34$, $I^2 = 0\%$, $P_{\text{heterogeneidade}} = 0,57$), respectivamente.

Tabela 4 - Associação do polimorfismo *IL6* -174 G>C com a dengue entre o grupo DSSA e o grupo Controle

DSSA vs. Controle Modelo genético	Frequência DSSA/Controle	Teste de associação		Teste de heterogeneidade		
		OR [IC 95%]	P^*	I^2	P	ME
MHO (CC vs. GG)	37/42	1,12 [0,69 – 1,81]	0,65	27%	0,25	F
MHE (GC vs. GG)	126/207	0,76 [0,39 – 1,48]	0,41	77%	0,01	R
	74/173	0,57 [0,41 – 0,80]	0,001**	0%	0,39	F
MRE (CC vs. GC+GG)	37/42	1,26 [0,78 – 2,02]	0,34	0%	0,57	F
MDO (CC+GC vs. GG)	163/249	0,82 [0,43 – 1,57]	0,54	78%	0,01	R
	101/211	0,63 [0,47 – 0,86]	0,004**	28%	0,24	F
MAL (C vs. G)	200/291	0,90 [0,56 – 1,46]	0,67	75%	0,02	R
	128/249	0,77 [0,60 – 0,99]	0,04**	48%	0,17	F

MHO: modelo homozigoto; MHE: modelo heterozigoto; MRE: modelo recessivo; MDO: modelo dominante; MAL: modelo alélico; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; P^* : valor- p para OR; I^2 : heterogeneidade; P : valor- p para I^2 ; ME: modelo de efeito; R: modelo de efeito aleatório; F: modelo de efeito fixado; **: significância de valor- p após exclusão de um estudo.

Fonte: Autoria própria

O modelo recessivo e o modelo dominante foram avaliados para determinar a importância do genótipo heterozigoto. Ao analisar o genótipo heterozigoto em conjunto com o genótipo homozigoto polimórfico (modelo dominante), considerando que o alelo variante seja dominante, o SNP foi associado à proteção contra DSSA. Porém, quando analisados separadamente (modelo recessivo), considerando que o alelo polimórfico seja recessivo, o genótipo CC foi associado à susceptibilidade. Assim, nota-se que na análise de ambos os modelos genéticos, o genótipo GC foi associado à proteção contra DSSA, confirmando o resultado da análise do modelo heterozigoto.

Na comparação do grupo DSSA versus o grupo controle, nos modelos heterozigoto, dominante e alélico, três estudos foram inclusos. Por um desses estudos aumentar a

heterogeneidade, ele foi excluído da comparação (CANSANÇÃO et al., 2016a), que além de deixar os estudos mais homogêneos, a associação entre os dois estudos restantes (QUEIROZ et al., 2021; MOREIRA et al., 2008) mostraram resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Embora as outras comparações (DCSA vs. controle; DCSA vs. DSSA) não tenham obtido resultados significativos, os valores do OR na comparação DCSA versus grupo controle, mostrados na Tabela 5 e Apêndice B, indicam que o genótipo heterozigoto ($OR = 0,72$, $IC = 0,41 - 1,25$, $p = 0,24$, $I^2 = 0\%$, $P_{\text{heterogeneidade}} = 0,39$) e o alelo variante C ($OR = 0,86$, $IC = 0,57 - 1,29$, $p = 0,46$, $I^2 = 12\%$, $P_{\text{heterogeneidade}} = 0,29$) estão associados à proteção, como visto na comparação DSSA versus grupo controle, mas sem significância. As comparações entre os genótipos do grupo DCSA com o grupo DSSA são mostradas na Tabela 6 e Apêndice C.

Os resultados dos testes de Begg e Egger indicaram ausência de evidências de viés de publicação validando nossos resultados (Tabela 7). Além disso, qualquer assimetria óbvia foi detectada pelo *funnel plot* (Apêndice D).

Tabela 5 - Associação do polimorfismo *IL6* -174 G>C com a dengue entre o grupo DCSA e o grupo Controle

DCSA vs. Controle Modelo genético	Frequência DCSA/Controle	Teste de associação		Teste de heterogeneidade		
		OR [IC 95%]	P*	I ²	P	ME
MHO (CC vs. GG)	9/20	0,99 [0,42 – 2,35]	0,98	0%	0,60	F
MHE (GC vs. GG)	24/79	0,72 [0,41 – 1,25]	0,24	0%	0,39	F
MRE (CC vs. GC+GG)	9/20	1,07 [0,46 – 2,49]	0,87	0%	0,73	F
MDO (CC+GC vs. GG)	33/99	0,77 [0,46 – 1,28]	0,31	8%	0,30	F
MAL (C vs. G)	42/119	0,86 [0,57 – 1,29]	0,46	12%	0,29	F

MHO: modelo homozigoto; MHE: modelo heterozigoto; MRE: modelo recessivo; MDO: modelo dominante; MAL: modelo alélico; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; P*: valor-p para OR; I²: heterogeneidade; P: valor-p para I²; ME: modelo de efeito; R: modelo de efeito aleatório; F: modelo de efeito fixado.

Fonte: Autoria própria

Tabela 6 - Associação do polimorfismo *IL6* -174 G>C com a dengue entre o grupo DCSA e o grupo DSSA

DCSA vs. DSSA Modelo genético	Frequência DCSA/DSSA	Teste de associação		Teste de heterogeneidade		
		OR [IC 95%]	P*	I ²	P	ME
MHO (CC vs. GG)	4/5	1,35 [0,34 – 5,28]	0,67	0%	0,85	F
MHE (GC vs. GG)	18/29	1,06 [0,53 – 2,10]	0,88	0%	0,42	F
MRE (CC vs. GC+GG)	4/5	1,34 [0,35 – 5,18]	0,67	0%	0,76	F
MDO (CC+GC vs. GG)	22/34	1,10 [0,58 – 2,10]	0,77	0%	0,54	F
MAL (C vs. G)	26/39	1,12 [0,65 – 1,95]	0,67	0%	0,71	F

MHO: modelo homozigoto; MHE: modelo heterozigoto; MRE: modelo recessivo; MDO: modelo dominante; MAL: modelo alélico; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; P*: valor-p para OR; I²: heterogeneidade; P: valor-p para I²; ME: modelo de efeito; R: modelo de efeito aleatório; F: modelo de efeito fixado.

Fonte: Autoria própria

Tabela 7 - Valores do teste de regressão linear de Egger e teste de Begg para detecção de viés de publicação nas comparações entre o grupo DSSA e o grupo Controle

DSSA vs. Controle Modelo genético	Viés de Publicação		
	ME	Begg	Egger
MHO (CC vs. GG)	F	1,00000	0,88724
MHE (GC vs. GG)	R	1,00000	0,76608
	F	NO	NO
MRE (CC vs. GC+GG)	F	1,00000	0,99414
MDO (CC+GC vs. GG)	R	1,00000	0,81026
	F	NO	NO
MAL (C vs. G)	R	1,00000	0,97338
	F	NO	NO

MHO: modelo homozigoto; MHE: modelo heterozigoto; MRE: modelo recessivo; MDO: modelo dominante; MAL: modelo alélico; ME: modelo de efeito; R: modelo de efeito aleatório; F: modelo de efeito fixado; NO: não obtido por limitação de poder estatístico.

Fonte: Autoria própria

5 DISCUSSÃO

As citocinas são moléculas que atuam na modulação de processos patológicos. Dessa forma, durante o processo patológico da dengue a quantidade de citocinas é alterada, estando em níveis altos ou baixos, o que influencia na gravidade da doença (AVENDAÑO-TAMAYO et al., 2017).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica, possui atividade pró-inflamatória e implica em diversos processos patológicos e no desenvolvimento de diversas doenças quando sua expressão é desregulada (JORDAN et al., 2017; SCHETT, 2018; SOUZA et al., 2008; TANAKA et al., 2016). Essa molécula tem participação no sistema imunológico e vascular, bem como em outros processos biológicos (LYU et al., 2019; SCHETT, 2018). A IL-6 atua na diferenciação de monócitos em macrófagos, promove a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que induz a angiogênese, favorecendo o aumento da permeabilidade vascular (BATES et al., 2002; PARK et al., 2019; SCHETT, 2018).

Na infecção por DENV, a modulação das citocinas é alterada e esse desequilíbrio está envolvido no aparecimento de sintomas característicos da doença (CANSANÇÃO et al., 2016b). Diante disso, o estudo de polimorfismos em genes de citocinas é de fundamental importância para encontrar padrões na produção desses elementos, pois dependendo da quantidade desses produtos que circulam no organismo, favorece o aparecimento de sintomas e proporciona o avanço ou regressão da doença (AVENDAÑO-TAMAYO et al., 2017; FEITOSA et al., 2016).

O gene *IL6* está localizado no cromossomo 7p21.24. O SNP *IL6* -174 G>C consiste na mudança de uma guanina para uma citosina, a qual modula a produção de IL-6 (DETTOGNI et al., 2015; FISHMAN et al., 1998; JI et al., 2019; PIERONI et al., 2007; TETZLAFF et al., 2018). Não há muitos estudos na literatura que associem o polimorfismo no gene *IL6* na posição -174 G>C com dengue, o que limitou nossa análise.

No estudo realizado por Cansanção et al. (2016a) na região Nordeste do Brasil, ao analisar esse polimorfismo isoladamente, não foram encontrados resultados significativos que indiquem proteção ou suscetibilidade à dengue. No entanto, em nosso estudo, descobrimos que o genótipo GC está associado à proteção contra a DSSA (Tabela 4), o que está de acordo com Moreira et al. (2008) e Queiroz et al. (2021), que associaram o genótipo GC do polimorfismo rs1800795 com a proteção contra DSSA (OR = 0,62 [0,42 - 0,91], $p = 0,015$) (OR = 0,45 [0,24 - 0,85], $p = 0,013$), respectivamente.

Embora o presente estudo não tenha analisado o nível plasmático de IL-6, deduz-se que haja uma relação entre o genótipo e a expressão do gene *IL6*. No estudo de Moreira et al. (2008), o autor sugere que o polimorfismo genético rs1800795 está associado ao aumento da produção de IL-6, contrariando alguns estudos, como o de Cansanção et al. (2016a), Dettogni et al. (2015), Fernández-Real et al. (2000) e Pieroni et al. (2007), que sustentam o conceito de que esse polimorfismo está relacionado com a diminuição da expressão do gene *IL6*, resultando na redução da concentração plasmática de IL-6.

Há um consenso de que o alelo polimórfico C está associado à baixa expressão do gene *IL6*, o que resulta na diminuição do nível de IL-6 no plasma (FISHMAN et al., 1998; PIERONI et al., 2007; TETZLAFF et al., 2018). No presente estudo, a análise entre os alelos C e G demonstrou que o alelo variante está relacionado à proteção contra DSSA (Tabela 4), o que está em consonância com Queiroz et al. (2021), que também associou o alelo polimórfico C com a proteção contra a DSSA ($p = 0,027$). Assim, sugere-se que quantidades reduzidas de IL-6 teriam um impacto positivo contra o desenvolvimento da DSSA. Porém, não se pode afirmar que os portadores de dois alelos polimórficos (CC) estejam fortemente protegidos contra o desenvolvimento dessa doença. De acordo com nossos resultados, na análise do modelo homozigoto, o genótipo variante homozigoto não obteve significância nessa comparação (Tabela 4).

No estudo de Perez et al. (2010) realizado em Cuba, ao analisar a distribuição alélica e genotípica do SNP *IL6* -174 G>C entre o grupo DCSA e o grupo controle, foi observado que não houve diferença significativa. Fernández-Mestre et al. (2004), em seu estudo realizado em pacientes venezuelanos, revelaram que existe uma distribuição alélica e genotípica sem diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com DCSA e pacientes com DSSA. Em contrapartida, nossos resultados mostram que existe uma diferença significativa na frequência do genótipo GG entre o grupo DCSA e o grupo controle, com maior número de pacientes com esse genótipo no grupo DCSA ($p = 0,0221$) (Tabela 3). Além disso, também evidenciamos que o genótipo heterozigoto é mais frequente nos indivíduos do grupo controle ($p = 0,0119$) do que nos indivíduos do grupo DCSA (Tabela 3).

Esses resultados podem ser explicados com base em dados anteriores constantes na literatura. Para isso, vale ressaltar que a IL-6 promove aumento da permeabilidade vascular por indução de VEGF e o alelo G está associado a níveis plasmáticos mais elevados dessa citocina, por ser um ativador de transcrição mais forte do que o alelo C, sendo este último relacionado à baixa produção de IL-6 (BATES et al., 2002; DETTOGNI et al., 2015; FERNÁNDEZ-REAL et al., 2000; FISHMAN et al., 1998; PIERONI et al., 2007; SCHETT, 2018; TETZLAFF et al.,

2018). Dessa forma, é natural a ocorrência de uma menor frequência do genótipo heterozigoto e uma maior frequência do genótipo homozigoto selvagem no grupo DCSA devido ao fato de que esse genótipo selvagem estar associado a um alto nível de IL-6, o que promove vazamento de líquidos, aumentando a permeabilidade vascular, característica da DCSA. Além disso, é possível correlacionar esses dados com alguns estudos que relataram que níveis plasmáticos mais elevados de IL-6 foram observados em casos de DCSA (IANI et al., 2016; HERNÁNDEZ et al., 2016; KURANE, 2007).

Na DSSA, no início da infecção por DENV, a IL-6 promove a erradicação viral pela ativação da resposta imune Th1, e caso essa erradicação não ocorra e a doença progrida para DCSA, a resposta imunológica Th1 na DSSA passa a ser Th2 na DCSA, e é nesta resposta que os níveis de IL-6 tendem a aumentar, associando os níveis abundantes de IL-6 na progressão da DCSA (CHATURVEDI et al., 2000; CHEN et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2016; MASOOD et al., 2018; MOREIRA et al., 2008). Além disso, o aumento da expressão de IL-6 pode afetar as funções das células Th1 e das células T CD8⁺, favorecendo a persistência viral (HOU et al., 2014; SALINAS et al., 2019).

Nas formas graves de infecção por DENV ocorre um desequilíbrio do processo inflamatório (CANSANÇÃO et al., 2016b). A IL-6 pode promover a produção de antiplaquetário e ativador do plasminogênio tecidual, o que causará uma coagulação deficiente, resultando em vazamento de plasma e sangramentos (IANI et al., 2016). Assim, o SNP *IL6* -174 G>C reduz essas ocorrências, visto que há uma menor produção de IL-6. Vale ressaltar que existem outras citocinas e outros fatores, como aspectos ambientais, que podem influenciar a patogênese da dengue (HERNÁNDEZ et al., 2016). O desequilíbrio nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias está relacionado ao aparecimento de sintomas e sinais clínicos, isso ocorre devido a existência de uma resposta pró-inflamatória sem uma regulação anti-inflamatória eficiente (IANI et al., 2016). O uso de antagonistas de citocinas é uma alternativa de intervenção terapêutica que visa reduzir as manifestações características da dengue ou prevenir o agravamento da doença (PATRO et al., 2019).

Embora nossos resultados tenham mostrado que o polimorfismo rs1800795 está associado à proteção contra DSSA, destaca-se que existem outras citocinas e outros polimorfismos que atuam na expressão do gene *IL6*, o que implica na ativação de vários mecanismos imunopatológicos que levam a diferentes desfechos da doença (CAHILL et al., 2018; HERNÁNDEZ et al., 2016; USECHE et al., 2018).

Embora a presente metanálise traga novos dados relevantes sobre a associação entre o polimorfismo rs1800795 no gene *IL6* e o risco de desenvolver quadro clínico da dengue,

algumas limitações devem ser observadas e discutidas. Primeira, comparamos um grupo de indivíduos saudáveis ou com diagnóstico negativo para dengue com um grupo de indivíduos positivos para dengue. Entretanto, a realização de estudos comparando indivíduos assintomáticos infectados pelo DENV com indivíduos sintomáticos infectados pelo DENV seria uma alternativa para buscar a compreensão do comportamento desse polimorfismo diante dos sintomas da doença, estabelecendo se ele está fortemente associado ou não à dengue. Se faz necessário a realização de mais estudos que correlacionem esse SNP com a dengue para buscar um melhor entendimento de sua relação com a suscetibilidade ou proteção para esta doença. Segunda, o amplo espectro de manifestações clínicas da dengue pode ser um desafio em estudos genéticos transversais que apresentem maior risco de viés nos dados, especialmente quando se leva em consideração as manifestações clínicas incomuns da doença que confundem as pesquisas (ESFOLETE et al., 2019). Terceira, a influência da etnia na frequência dos polimorfismos genéticos e seu papel nas doenças infecciosas são pré-determinantes e devem ser consideradas em estudos de metanálise. No entanto, os dados disponíveis na literatura não permitiram uma avaliação étnica completa, o que pode representar uma fonte potencial de viés. Quarta, a avaliação de outras variações genéticas em formas de haplótipos com o polimorfismo rs1800795 pode esclarecer o papel exato dessa alteração genética na dengue. Estudos futuros devem se concentrar em avaliar a combinação de outros SNP no gene *IL6*, como haplótipos, e a doença.

6 CONCLUSÃO

A análise mostrou que o genótipo heterozigoto GC e o alelo variante C do SNP rs1800795 têm um papel protetor contra dengue sem sinais de alarme (DSSA). Notou-se que o genótipo GC é mais frequente no grupo controle quando comparadas as distribuições genótípicas entre os grupos DCSA e Controle, e o genótipo GG é mais frequente no grupo DCSA, o que indica uma possível relação do genótipo do tipo selvagem com DCSA. Pesquisas futuras são necessárias para validar nossos resultados.

REFERÊNCIAS

- AVENDAÑO-TAMAYO, E.; CAMPO, O.; CHACÓN-DUQUE, J.C.; RAMÍREZ, R.; ROJAS, W.; AGUDELO-FLÓREZ, P.; BEDOYA, G.; RESTREPO, B.N. Variantes en los genes TNFA, IL6 e IFNG asociadas con la gravedad del dengue en una muestra de población colombiana. **Biomédica**, v.37, n. 4, p. 486-497, 2017.
- BATES, D.O.; HILLMAN, N.J.; POCOCK, T.M.; NEAL, C.R. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Journal of Anatomy**, v. 200, n. 5, 2002.
- BEGUM, F.; DAS, S.; MUKHERJEE, D.; MAL, S.; RAY, U. Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans. **Viruses**, v. 11, n. 12, 2019.
- BIOESTAT: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Version 5.3. Belém: Manuel Ayres, Manuel Ayres Jr., Daniel Lima Ayres, Alex de Assis Santos dos Santos. 2007. Disponível em: <<https://www.mamiraua.org.br>> Acesso em: 19 maio 2020
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 01 a 53, 2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 3, p. 1-31, 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**: volume único. 2 ed. Brasília, DF, 2017, 705p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue**: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. 5 ed. Brasília, DF, 2016, 58p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue**: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. 4 ed. Brasília, DF, 2013, 80p.
- CAHILL, M.E.; CONLEY, S.; DEWAN, A.T.; MONTGOMERY, R.R. Identification of genetic variants associated with dengue or West Nile virus disease: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, 2018.
- CANSANÇÃO, I.F.; DO CARMO, A.P.S.; LEITE, R.D.; PORTELA, R.D.P.; PAIVA JÚNIOR, S.S.L.; BALBINO, V.Q.; RABENHORST, S.H.B. Association of genetic polymorphisms of IL1 β -511 C>T, IL1RN VNTR 86 bp, IL6 -174 G>C, IL10 -819 C>T and TNF α -308 G>A, involved in symptomatic patients with dengue in Brazil. **Inflammation Research**, v. 65, p. 925–932, 2016a.
- CANSANÇÃO, I.F.; CARMO, A.P.S.; LEITE, R.D.; RABENHORST, S.H.B. Association of Polymorphisms in IL1 β -511 C>T, IL1RN 86 bp VNTR, and IL6 -174G>C Genes with Clinical Dengue Signs and Symptoms in Brazilian Dengue Patients. **Viral Immunology**, v. 29, n. 6, p. 372-376, 2016b.
- CHATURVEDI, U.C.; AGARWAL, R.; ELBISHBISHI, E.A.; MUSTAFA, A.S. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 183-188, 2000.
- CHEN, J.; NG, M.M.; CHU, J.J. Molecular profiling of T-helper immune genes during dengue virus infection. **Virology Journal**, v. 5, 2008.
- CHEN, J.; NG, M.M.; CHU, J.J. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 7, 2015.
- CHONG, H.Y.; LEOW, C.Y.; MAJEED, A.B.A.; LEOW, C.H. Flavivirus Infection- A Review of Immunopathogenesis, Immunological Response, and Immunodiagnosis. **Virus Research**, v. 274, 2019.
- COLOMBO, T.E.; VEDOVELLO, D.; PACCA-MAZARO, C.C.; MONDINI, A.; ARAÚJO JR., J.P.; CABRERA, E.; LOPES, J.C.; SANTOS, I.N.P.; REIS, A.F.N.; COSTA, F.R.; CRUZ, L.E.A.A.; FERREIRA JR., J.; ROCHA, E.S.O.; KROON, E.G.; BRONZONI, R.V.M.; VASILAKIS, N.; NOGUEIRA, M.L. Dengue

virus surveillance: detection of DENV-4 in the city of São José do Rio Preto, SP, Brazil. **Acta Tropica**, v. 164, p. 84-89, 2016.

COMPREHENSIVE META-ANALYSIS (CMA). Version 3. Englewood: Borenstein, M., Hedges, L., Higgins, J., Rothstein, H. 2013. Disponível em: <<https://www.meta-analysis.com>> Acesso em: 23 dezembro 2019

DETTOGNI, R.S.; TRISTÃO-SÁ, R.; SANTOS, M.; SILVA, F.F.; LOURO, I.D. Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons. **Human Immunology**, v. 76, n. 10, p. 717-723, 2015.

DUAN, Y.; ZENG, M.; JIANG, B.; ZHANG, W.; WANG, M.; JIA, R.; ZHU, D.; LIU, M.; ZHAO, X.; YANG, Q.; WU, Y.; ZHANG, S.; LIU, Y.; ZHANG, L.; YU, Y.; PAN, L.; CHEN, S.; CHENG, A. Flavivirus RNA-Dependent RNA Polymerase Interacts with Genome UTRs and Viral Proteins to Facilitate Flavivirus RNA Replication. **Viruses**, v. 11, n. 10, 2019.

ESFOLETE, C.F.; MOTA, M.T.O.; TERZIAN, A.C.B.; MILHIM, B.H.G.A.; RIBEIRO, M.R.; NUNES, D.V.; MOURÃO, M.P.; ROSSI, S.L.; NOGUEIRA, M.L.; VASILAKIS, N. Unusual clinical manifestations of dengue disease – real or imagined? **Acta Tropica**, v. 199, 2019.

FEITOSA, R.N.M.; VALLINOTO, A.C.R.; VASCONCELOS, P.F.C.; AZEVEDO, R.S.S.; AZEVEDO, V.N.; MACHADO, L.F.A.; LIMA, S.S.; ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R. Gene Polymorphisms and Serum Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Markers in Dengue Viral Infections. **Viral Immunology**, v. 29, n. 7, p. 379-388, 2016.

FERNÁNDEZ-MESTRE, M.; GENDZEKHADZE, K.; RIVAS-VETENCOURT, P.; LAYRISSE, Z. TNF- α -308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, v. 64, p. 469-472, 2004.

FERNÁNDEZ-REAL, J.M.F.; BROCH, M.; RICHART, J.V.C.; RICART, W. Interleukin-6 Gene Polymorphism and Lipid Abnormalities in Healthy Subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 3, p. 1334–1339, 2000.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J.S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, p. 1369-1376, 1998.

GAO, M.; WAGGONER, J.J.; HECHT, S.M.; CHEN, S. Selective Detection of Dengue Virus Serotypes Using Tandem Toehold-Mediated Displacement Reactions. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 11, 2019.

GUBLER, D.J. Dengue e febre hemorrágica da dengue. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D.J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. In: New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases: **Novartis Foundation Symposium**, v. 277, p. 3-22, 2006.

GUPTA, S.; AGARWAL, A.; BISWAS, D. Host genetic polymorphisms influencing susceptibility to dengue. **DNA and Cell Biology**, v. 37, p. 805-807, 2018.

HALSTEAD, S.B. Travelling arboviruses: A historical perspective. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 31, 2019.

HERNÁNDEZ, S.I.C.; GUARDO, H.N.P.; AGUILAR, H.F.; MATEOS, S.G.; MARTINEZ, I.L.; NAVARRETE, V.O.; LUDERT, J.E.; DEL ANGEL, R.M. Primary dengue virus infections induce differential cytokine production in Mexican patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 3, p. 161-167, 2016.

HOU, W.; JIN, Y.H.; KANG, H.S.; KIM, B.S. Interleukin-6 (IL-6) and IL-17 synergistically promote viral persistence by inhibiting cellular apoptosis and cytotoxic T cell function. **Journal of Virology**, v. 88, p. 8479-8489, 2014.

- IANI, F.C.M.; CALDAS, S.; DUARTE, M.M.; CURY, A.L.F.; CECÍLIO, A.B.; COSTA, P.A.C.; ANTONELLI, L.R.; GOLLOB, K.J. Dengue Patients with Early Hemorrhagic Manifestations Lose Coordinate Expression of the Anti-Inflammatory Cytokine IL-10 with the Inflammatory Cytokines IL-6 and IL-8. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 1, p. 193-200, 2016.
- JI, Y.; JIANG, X.; LI, W.; GE, X. Impact of interleukin-6 gene polymorphisms and its interaction with obesity on osteoporosis risk in Chinese postmenopausal women. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 24, 2019.
- JORDAN, S.; CHOI, J.; KIM, I.; WU, G.; TOYODA, M.; SHIN, B.; VO, A. Interleukin-6, a cytokine critical to mediation of inflammation, autoimmunity and allograft rejection. **Transplantation**, v. 101, p. 32-44, 2017.
- KYAW, A.K.; TUN, M.M.N.; NAING, S.T.; HTET, K.K.K.; HTWE, T.T.; KHAING, Y.Y.; MAR, T.T.; AUNG, T.; WIN, K.N.; TAR, T.; AYE, K.S.; THANT, K.Z.; MORITA, K. Evaluation of commercially available three dengue rapid diagnostic test kits for diagnosis of acute dengue virus infection at the point-of-care setting in Myanmar. **Journal of Virological Methods**, v. 273, 2019.
- KURANE, I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. Comparative Immunology. **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, p. 329-340, 2007.
- LIMA, M.R.Q.; CHOUIN-CARNEIRO, T.; AZEREDO, E.; BARBOSA, L.S.; SOUZA, T.M.A.; DA SILVA, J.B.C.; NUNES, P.C.G.; FABBRO, M.D.; FACCO, I.H.R.; DA CUNHA, R.V.; DOS SANTOS, F.B. The inability of a dengue NS1 ELISA to detect Zika infections. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.
- LUNA, E.J.A.; FIGUEIREDO, G.M.; LEVI, J.E.; CAMPOS, S.; FELIX, A.C.; SOUZA, N.S.; FIGUEIREDO, W.M.; COSTA, A.A.; CARDOSO, M.R.A.; PANNUTI, C.S. A cohort study to assess the incidence of dengue, Brazil, 2014–2018. **Acta Tropica**, v. 204, 2020.
- LYU, X.; ZHANG, M.; LI, G.; CAI, Y.; LI, G.; QIAO, Q. Interleukin-6 production mediated by the IRE1-XBP1 pathway confers radioresistance in human papillomavirus-negative oropharyngeal carcinoma. **Cancer Science**, v. 110, n. 8, p. 2471-2484, 2019.
- MASOOD, K.I.; JAMIL, B.; RAHIM, M.; ISLAM, M.; FARHAN, M.; HASAN, Z. Role of TNF α , IL-6 and CXCL10 in Dengue disease severity. **Iranian journal of microbiology**, v. 10, p. 202–207, 2018.
- MOHER, D.; LIBERATI, A.; TETZLAFF, J.; ALTMAN, D.G.; PRISMA GROUP. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **PLoS medicine**, v. 6, n. 7, 2009.
- MOREIRA, S.T.; CARDOSO, D.M.; VISENTAINER, J.E.; FONZAR, U.J.V.; MOLITERNO, R.A. The Possible Protective Role of the IL6-174GC Genotype in Dengue Fever. **The Open Tropical Medicine Journal**, 2008, v. 1, p. 87-91, 2008.
- PABALAN, N.; CHAISRI, S.; TABUNHAN, S.; PHUMYEN, A.; JARJANAZI, H.; STEINER, T.S. Associations of DC-SIGN (CD209) promoter –336 G/A polymorphism (rs4804803) with dengue infection: a systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 177, p. 186-193, 2018.
- PARK, Y.T.; LEE, S.M.; KOU, X.; KARABUCAK, B. The Role of Interleukin 6 in Osteogenic and Neurogenic Differentiation Potentials of Dental Pulp Stem Cells. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 11, p. 1342-1348, 2019.
- PATRA, G.; MALLIK, S.; SAHA, B.; MUKHOPADHYAY, S. Assessment of chemokine and cytokine signatures in patients with dengue infection: a hospital-based study in Kolkata, India. **Acta Tropica**, v. 190, p. 73-79, 2019.
- PATRO, A.R.K.; MOHANTY, S.; PRUSTY, B.K.; SINGH, D.K.; GAIKWAD, S.; SASWAT, T.; CHATTOPADHYAY, S.; DAS, B.K.; TRIPATHY, R.; RAVINDRAN, B. The Cytokine Signature Associated with Disease Severity in Dengue. **Viruses**, v. 11, n. 1, 2019.
- PEREZ, A. B.; SIERRA, B.; GARCIA, G.; AGUIRRE, E.; BABEL, N.; ALVAREZ, M.; SANCHEZ, L.; VALDES, L.; VOLK, H.D.; GUZMAN, M.G. Tumor necrosis factor–alpha, transforming growth factor– β 1, and

interleukin-10 gene polymorphisms: implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. **Human Immunology**, v. 71, n. 11, p. 1135-1140, 2010.

PIERONI, F.; LOURENÇO, D.M.; MORELLI, V.M.; MAFFEI, F.H.; ZAGO, M.A.; FRANCO, R.F. Cytokine gene variants and venous thrombotic risk in the BRATROS (BRAZILIAN THROMBOSIS STUDY). **Thrombosis Research**, v. 120, n. 2, p. 221-229, 2007.

QUEIROZ, J.L.; MACIEL, M.S.C.; TELES, L.S.; VIEIRA, S.M.A.; GOMES, T.N.; FERNANDES, H.F.; OLIVEIRA, J.S.; FERREIRA, G.P.; PEREIRA, A.C.T.C. Prevalence and influence of polymorphism -174 G/C of the IL-6 gene in association with dengue and chikungunya in Northeast Brazil patients. **Viral Immunology**, 2021. [under review]

RAAFAT, N.; BLACKSELL, S.D.; MAUDE, R.J. A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 11, p. 653-660, 2019.

REVIEW MANAGER (REVMAN). Version 5.3. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2014. Disponível em: <<https://training.cochrane.org>> Acesso em: 6 novembro 2019.

SALINAS, L.V.; RODRIGUEZ, A.V.; RODRIGUEZ, L.L.; BORCA, M.V. The role of interleukin 6 during viral infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1057, 2019.

SANTOS, N.C.; GOMES, T.N.; GÓIS, I.A.F.; OLIVEIRA, J.S.; COELHO, L.F.L.; FERREIRA, G.P.; SILVA, F.R.P.; PEREIRA, A.C.T.C. Association of single nucleotide polymorphisms in TNF- α (-308 G/A and -238 G/) to dengue: case control and meta-analysis study. **Cytokine**, v. 134, 2020.

SCHETT, G. Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. **Rheumatology**, v. 57, n. 2, p. 43-50, 2018.

SOUZA, J.R.M.; OLIVEIRA, R.T.; BLOTTA, M.H.S.L.; COELHO, O.R. Serum levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18) and C-reactive protein (CRP) in patients with type-2 diabetes and acute coronary syndrome without ST-segment elevation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 2, p. 94-99, 2008.

TAN, L.K.; WONG, W.Y.; YANG, H.T.; HUBER, R.G.; BOND, P.J.; NG, L.C.; MAURER-STROH, S.; HAPUARACHCHI, H.C. Flavivirus Cross-Reactivity to Dengue Nonstructural Protein 1 Antigen Detection. **Assays. Diagnostics**, v. 10, n. 1, 2020.

TANAKA, T.; NAZARAKI, M.; KISHIMOTO, T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. **Immunotherapy**, v. 8, p. 959-970, 2016.

TETZLAFF, W.F.; MEROÑO, T.; BOTTA, E.E.; MARTÍN, M.E.; SORROCHE, P.B.; BOERO, L.E.; CASTRO, M.; FRECHTEL, G.D.; REY, J.; DARUICH, J.; CERRONE, G.E.; BRITES, F. -174 G>C IL-6 polymorphism and primary iron overload in male patients. **Annals of Hematology**, v. 97, p. 1683-1687, 2018.

USECHE, Y. M; ALVES, M.R.; RESTREPO, B.N.; SALGADO, D.M.; NARVÁES, C.F.; CAMPO, O.; AVENDAÑO, E.; MARTÍNEZ, C.; CHACON-DUQUE, J.C.; BEDOYA, G. Single-Nucleotide Polymorphisms in NOD1, RIPK2, MICB, PLCE1, TNF, and IKBKE Genes Associated with Symptomatic Dengue in Children from Colombia. **Viral Immunology**, v. 31, n. 9, p. 613-623, 2018.

VIKRAM, K.; NAGPAL, B.N.; PANDE, V.; SRIVASTAVA, A.; SAXENA, R.; ANVIKAR, A.; DAS, A.; SINGH, H.; ANUSHRITA; GUPTA, S.K.; TULI, N.R.; TELLE, O.; YADAV, N.K.; VALECHA, N.; PAUL, R. An epidemiological study of dengue in Delhi, India. **Acta Tropica**, v. 153, p. 21-27, 2016.

WANG, Y.; ZHANG, P. Recent advances in the identification of the host factors involved in dengue virus replication. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 1, p. 23-31, 2017.

WARKENTIEN, T.; PAVLICEK, R. Dengue Fever: Historical Perspective and the Global Response. **Journal of Infectious Diseases and Epidemiology**, v. 2, n. 2, 2016.

WELLS, G.A.; SHEA, B.; O'CONNELL, D.; PETERSON, J.; WELCH, V.; LOSOS, M.; TUGWELL, P. **The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for Assessing the Quality of Nonrandomized Studies in Meta-Analyses.**

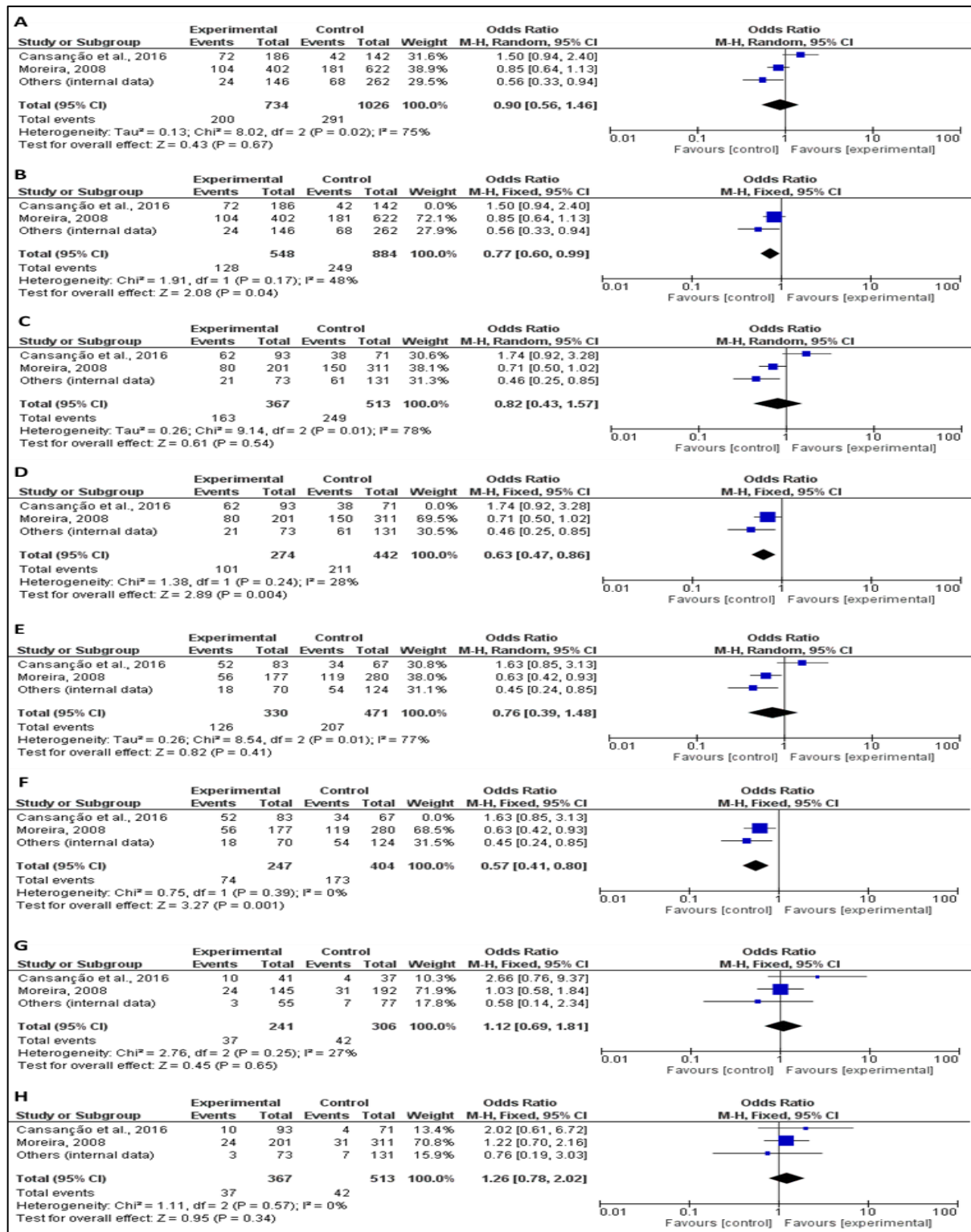
Ottawa Hospital Research Institute. 2014. Disponível em:
<http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp>. Acesso em: 08 ago. 2020

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue haemorrhagic fever**: diagnosis, treatment, prevention and control. 2 ed. Geneva, World Health Organization, 1997, 84p.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue**: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization, 2009, 147p.

YEN, T.Y.; SANTOS, M.J.T.; TSENG, L.F.; CHANG, S.F.; CHENG, C.F.; CARVALHO, A.V.A.; SHU, P.Y.; LIEN, J.C.; TSAI, K.H. Seroprevalence of antibodies against dengue virus among pregnant women in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe. **Acta Tropica**, v. 155, p. 58-62, 2016.

APÊNDICE A – *Forest plot* da comparação entre os grupos DSSA e Controle

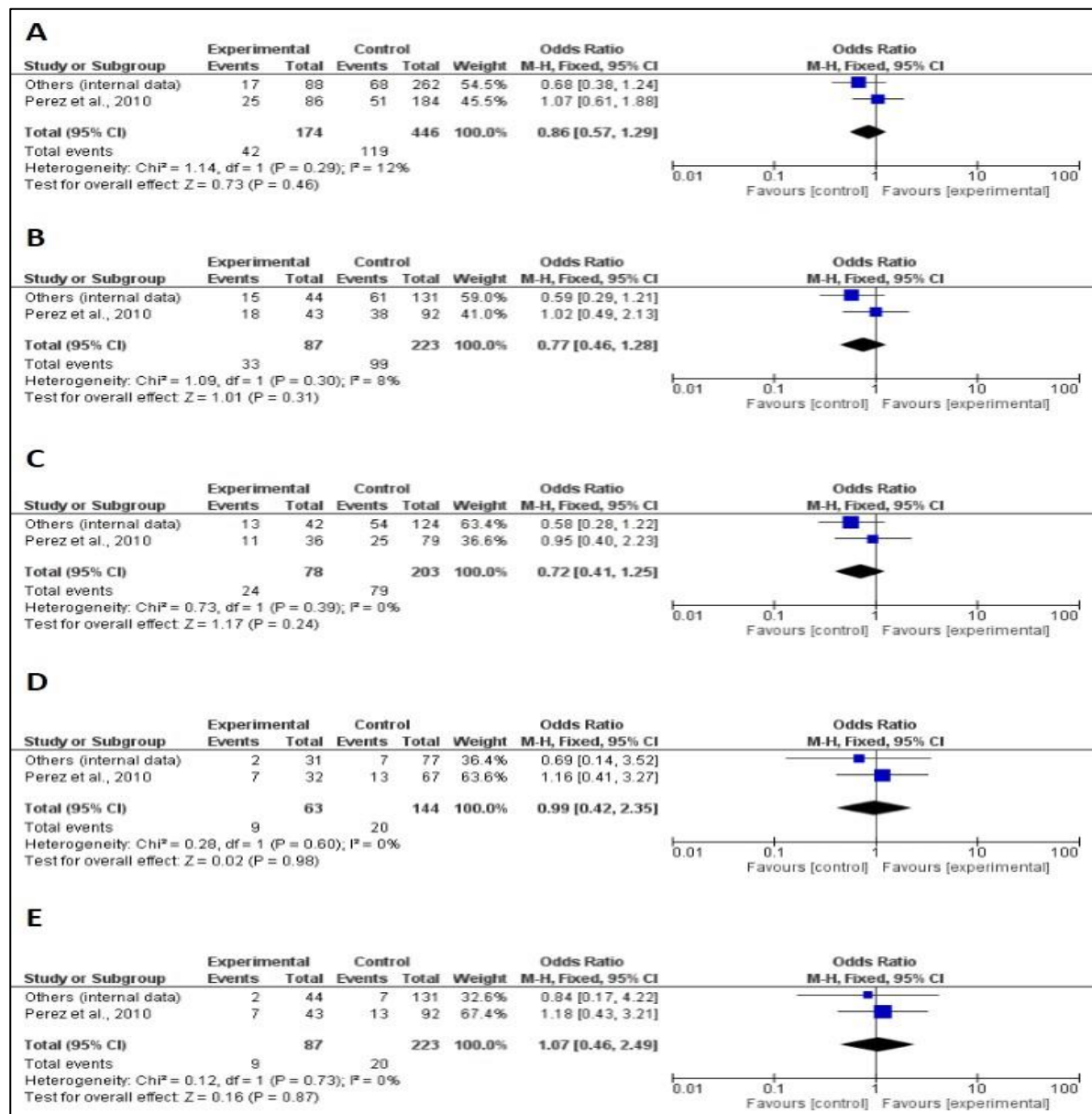


Fonte: Autoria própria

Forest plot da comparação entre os grupos DSSA versus Controle, comparando o alelo variante versus o alelo selvagem (A), o alelo variante versus o alelo do tipo selvagem em efeito

fixado excluindo o estudo de Cansanção et al. (2016a) (B), o genótipo homozigoto mutante mais genótipo heterozigoto versus o genótipo homozigoto selvagem (C), o genótipo homozigoto mutante mais o genótipo heterozigoto versus o genótipo homozigoto do tipo selvagem em efeito fixado excluindo o estudo de Cansanção et al. (2016a) (D), o genótipo heterozigoto versus o genótipo homozigoto do tipo selvagem (E), o genótipo heterozigoto versus genótipo homozigoto selvagem em efeito fixado excluindo o estudo de Cansanção et al. (2016a) (F), o genótipo homozigoto mutante versus o genótipo homozigoto selvagem (G) e comparando o genótipo homozigoto mutante versus o genótipo heterozigoto mais genótipo homozigoto do tipo selvagem (H), associando o polimorfismo rs1800795 no gene *IL6* e a dengue.

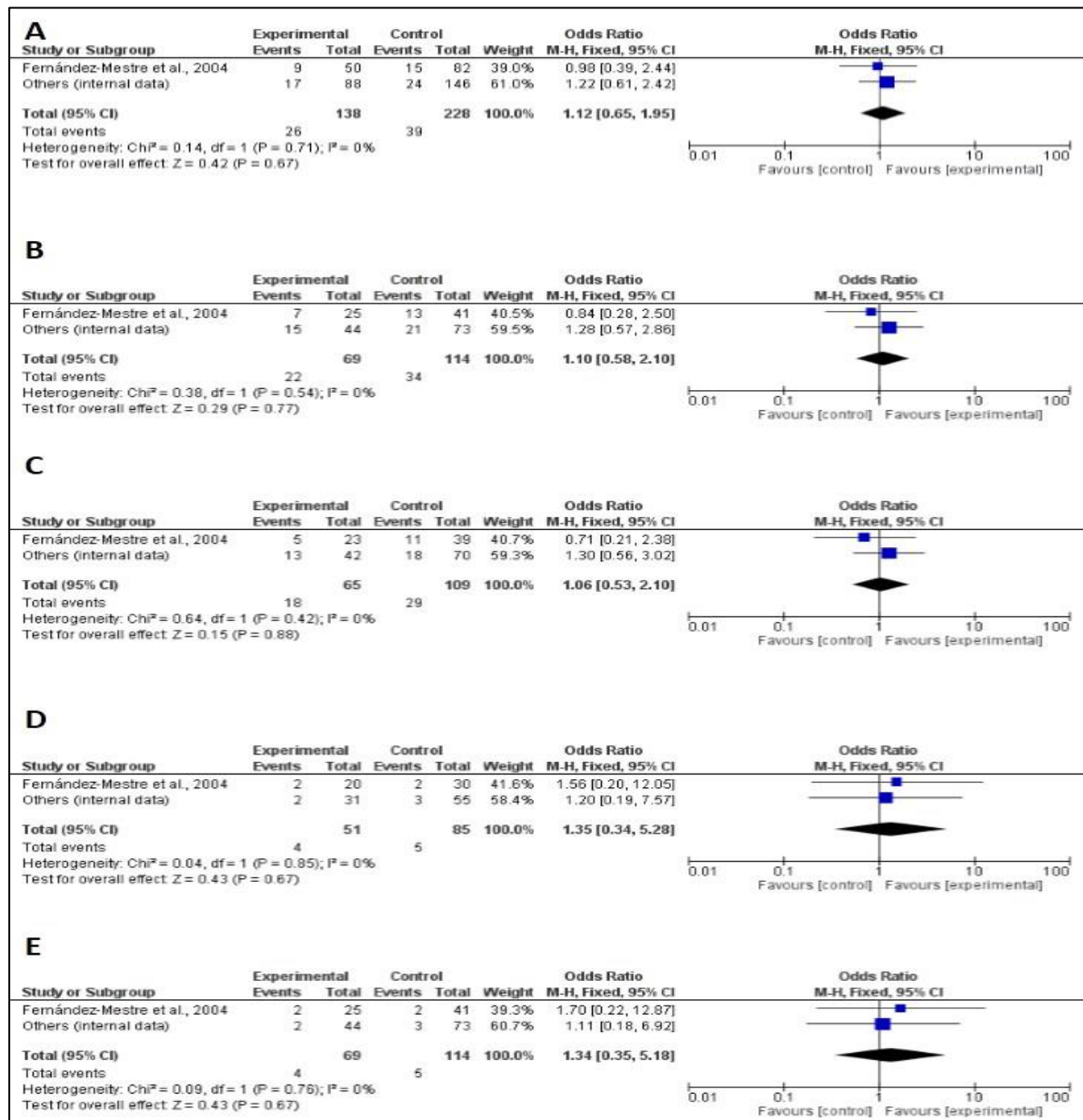
APÊNDICE B – *Forest plot* da comparação entre os grupos DCSA e Controle



Fonte: Autoria própria

Forest plot da comparação entre os grupos DCSA versus Controle, comparando o alelo variante versus o alelo selvagem (A), o genótipo homozigoto mutante mais genótipo heterozigoto versus o genótipo homozigoto selvagem (B), o genótipo heterozigoto versus o genótipo homozigoto do tipo selvagem (C), o genótipo homozigoto mutante versus o genótipo homozigoto selvagem (D) e comparando o genótipo homozigoto mutante versus o genótipo heterozigoto mais genótipo homozigoto do tipo selvagem (E), associando o polimorfismo rs1800795 no gene *IL6* e a dengue.

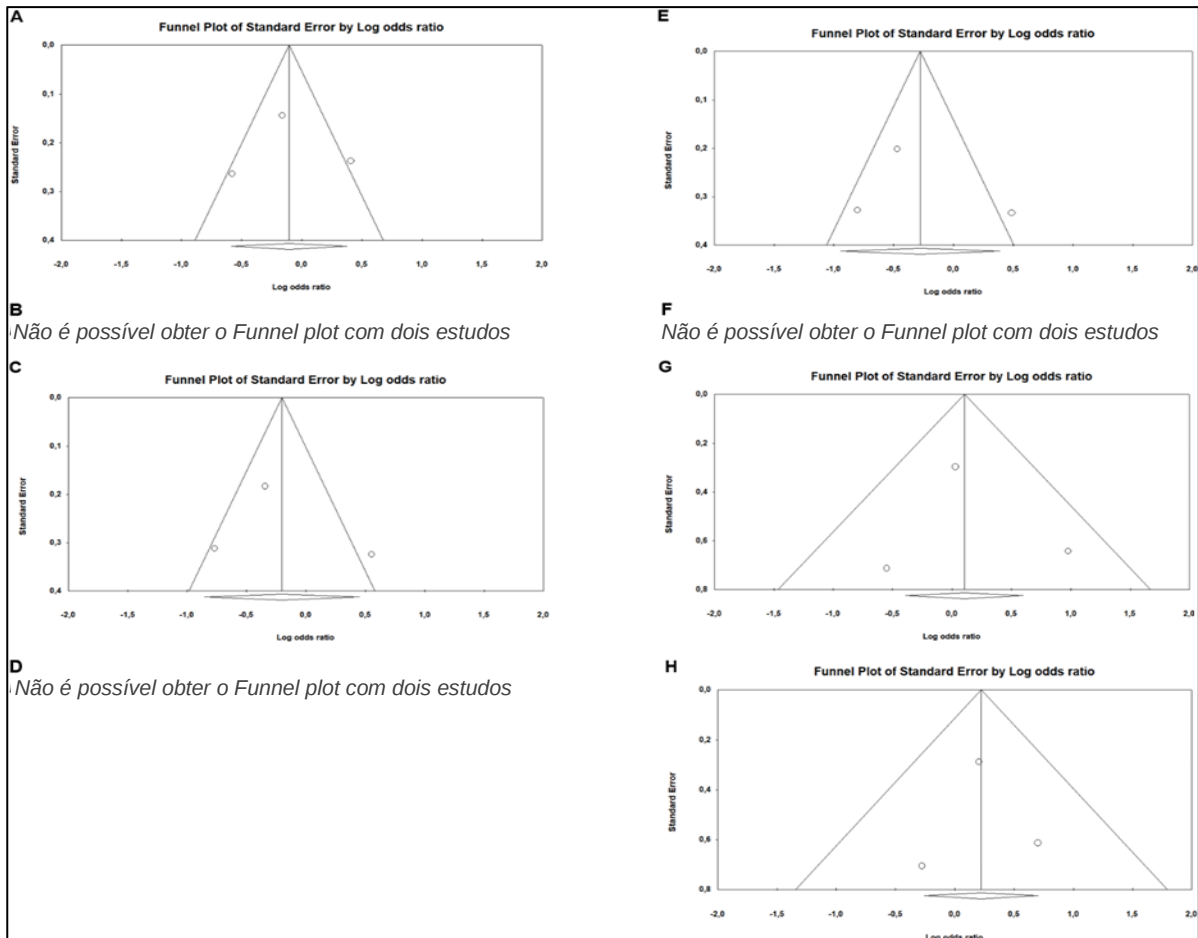
APÊNDICE C – *Forest plot* da comparação entre os grupos DCSA e DSSA



Fonte: Autoria própria

Forest plot da comparação entre os grupos DCSA versus DSSA, comparando o alelo variante versus o alelo selvagem (A), o genótipo homozigoto mutante mais genótipo heterozigoto versus o genótipo homozigoto selvagem (B), o genótipo heterozigoto versus o genótipo homozigoto do tipo selvagem (C), o genótipo homozigoto mutante versus o genótipo homozigoto selvagem (D) e comparando o genótipo homozigoto mutante versus o genótipo heterozigoto mais genótipo homozigoto do tipo selvagem (E), associando o polimorfismo rs1800795 no gene *IL6* e a dengue.

APÊNDICE D – *Funnel plot* da comparação entre os grupos DSSA e Controle



Fonte: Autoria própria

Funnel plot para detectar viés de publicação na comparação entre os grupos DSSA versus Controle comparando o alelo polimórfico versus o alelo do tipo selvagem em efeito aleatório (A), o alelo variante versus o alelo do tipo selvagem em efeito fixado excluindo o estudo de Cansanção et al. (2016a) (B), o genótipo mutante homozigoto mais o genótipo heterozigoto versus genótipo homozigoto do tipo selvagem em efeito aleatório (C), o genótipo homozigoto mutante mais o genótipo heterozigoto versus o genótipo homozigoto do tipo selvagem em efeito fixado excluindo o estudo de Cansanção et al. (2016a) (D), o genótipo heterozigoto versus o genótipo homozigoto selvagem em efeito aleatório (E), o genótipo heterozigoto versus genótipo homozigoto selvagem em efeito fixado excluindo o estudo de Cansanção et al. (2016a) (F), o genótipo homozigoto mutante versus o genótipo homozigoto selvagem em efeito fixado (G) e comparando o genótipo mutante homozigoto versus o genótipo heterozigoto mais genótipo homozigoto tipo selvagem em efeito fixado (H), associando o polimorfismo rs1800795 no gene *IL6* com a dengue.

ANEXO 1 – Publicação do artigo

Infection, Genetics and Evolution 91 (2021) 104778



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Research paper

What is the association between the *IL6*-174 G > C (rs1800795) polymorphism and the risk of dengue? Evidence from a meta-analysisLineker Alberto Araújo Frota^a, Naiany Carvalho Santos^{a,b}, Gustavo Portela Ferreira^{a,b}, Felipe Rodolfo Pereira da Silva^c, Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira^{a,b,*}^a Laboratory of Biology of Microorganisms, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí, Brazil^b Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Laboratório de Biologia de Microorganismos - BIOMIC, Av. São Sebastião, 2819, Bairro Reis Velloso, CEP 64202-020, Parnaíba - PI, Brazil^c Teaching Metropolitan Institute- Fametro, Manaus, Amazonas, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Arboviruses
Polymorphism
Cytokine
Disease susceptibility

ABSTRACT

The association of polymorphisms in genes responsible for immunological mediators with dengue allows the identification of certain genetic alterations that increase or decrease the development risk of the disease. A few number of studies that correlate the interleukin 6-174 G > C (*IL6*-174 G > C) polymorphism (rs1800795) with dengue. However, there is an inconsistency on the polymorphism influence on the disease which motivated this meta-analysis. So, this study aimed to evaluate the rs1800795 polymorphism with protection or susceptibility for development of dengue. A search of the literature was performed for studies published before 05 September 2020 in various databases. Calculations of Odds Ratio (OR) with 95% of Confidence Intervals (CI) and heterogeneity (I^2) were assessed and publication bias was done by Begg's and Egger's test. The value of $P < 0.05$ was considered as significant. As results, five case-control studies were identified and included in the results. The analysis showed that the heterozygous genotype has a protective role against dengue without warning signs (DWOS) (OR = 0.57, $p = 0.001$), as well as the polymorphic C allele (OR = 0.77, $p = 0.04$). When unifying the data from the included studies, the GG genotype was more prevalent among individuals with dengue with warning signs (DWWS) when compared to the control group ($p = 0.0221$). GC genotype was more prevalent in the control group than in the DWWS group ($p = 0.0119$). Therefore, in our study we observed that the GC genotype and the C allele have a protective role against DWOS. Since this polymorphism is associated with low *IL-6* expression, thus it is expected that there will be a decreased pro-inflammatory response. However, more studies regarding this thematic are necessary to have a consensus about this polymorphism and dengue.

1. Introduction

Dengue is a systemic viral disease transmitted to humans through the bites of *Aedes aegypti* and *albopictus* mosquitoes. As the *Dengue virus* (DENV) does not have a great diversity of hosts, the human-mosquito cycle remains the primary means of transmission. DENV belongs to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae*, has as genetic material a single-stranded RNA of positive sense and present four distinct serotypes, DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 (Chen et al., 2015; Warkentin and Pavlicek, 2016).

The disease had considerable epidemiology reaching a incidence density of 8.94 per 100 persons during 2014–2018 in Brazil (Luna et al.,

2020) and a seroprevalence of 35.9% for IgG antibody among pregnant women from Democratic Republic of Sao Tome and Principe (Yen et al., 2016). In addition, a high percentage of IgG was identified in individuals with 15–24 years old (36%) in Delhi, India (Vikram et al., 2016) and increased prevalence of dengue was observed in patients from the city of São José do Rio Preto, Brazil, which the authors analyzed 1549 samples and found 1389 positive samples for dengue by NS1 rapid test (Colombo et al., 2016).

A new protocol developed by the World Health Organization (WHO) in 2009 brought a new classification for the disease. Since 2014, Brazil has used this new classification, defining dengue as a unique, dynamic and systemic disease, which implies that DENV infection can regress or

* Corresponding author at: Laboratory of Biology of Microorganisms, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Piauí, Brazil.

E-mail address: actcp@ufpi.edu.br (A.C.T.C. Pereira).

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104778>

Received 2 December 2020; Received in revised form 29 January 2021; Accepted 18 February 2021

Available online 2 March 2021

1567-1348/Published by Elsevier B.V.

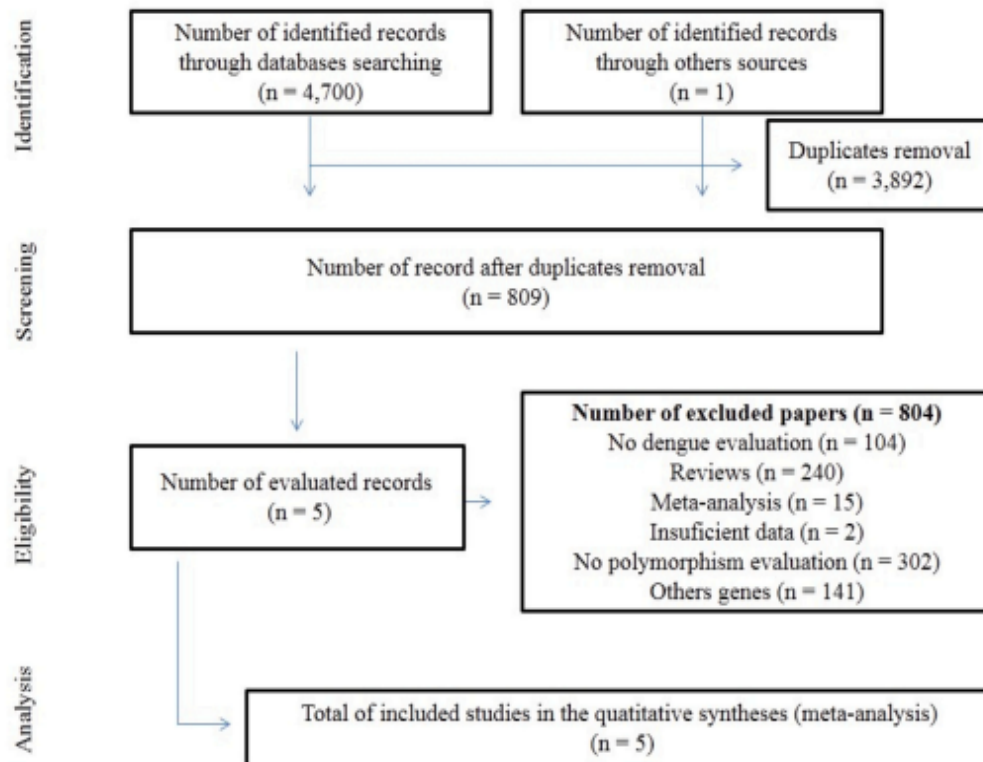


Fig. 1. Flow diagram for identification, screening, eligibility and analysis of included studies in this current systematic review and meta-analysis.

Table 1
Characteristics of included studies on the IL6-174 G/C polymorphism and the association with dengue.

First author, year	Country	Cases (n)	Control (n)	GM	NOS
Cansanção et al., 2016b	Brazil	DWOS (93)	ND (71)	PCR-RFLP	9
Perez et al., 2010	Cuba	DWWS (43)	Healthy (92)	PCR-SSP	7
Moreira et al., 2008	Brazil	DWOS (201)	N/I (311)	PCR-SSP	8
Fernández-Mestre et al., 2004	Venezuela	DWOS (41), DWWS (25)	Healthy (46)*	PCR-SSP	8
Queiroz et al., 2020	Brazil	DWOS (73), DWWS (44)	Healthy (131)	qPCR	8

DWOS: dengue without warning signs; DWWS: dengue with warning signs; n: number of individuals participating in the study; ND: symptomatic patients with negative diagnosis for dengue; N/I: not informed; *: not used in this meta-analysis, data unavailable; GM: genotyping method.

evolve in the host. Previously, according to criteria established by the WHO in 1997, dengue was classified as dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS), however with the new classification it becomes dengue without warning signs (DWOS), dengue with warning signs (DWWS) and severe dengue (SD). This form of distinction allows better assistance to patients according to the symptoms related to the disease (BRAZIL. Ministry of Health, 2017; BRAZIL. Ministry of Health, 2016; BRAZIL. Ministry of Health, 2013; WHO – World Health Organization, 2009; WHO – World Health Organization, 1997).

The disease progression to the more severe forms occurs with an increased risk in those individuals exposed to a secondary or consecutive infection by a different serotype (Chen et al., 2015). The

immunopathological mechanisms that contribute to the establishment of dengue comprise a complex chain of immune responses (Kurane, 2007). Cytokines and chemical mediators, for example, are involved in pathological processes that can correlate with disease severity. Interleukin 6 (IL-6) is a cytokine that is associated with the pathological process of dengue, due to this it has been the target of studies that seek to elucidate the pathogenesis of the disease (Avendaño-Tamayo et al., 2017; Dettogni et al., 2015; Iani et al., 2016; Patra et al., 2019; Patro et al., 2019).

There are several studies that associate genetic polymorphisms with different diseases. Polymorphisms in genes responsible for immunological mediators can determine whether positive individuals for these genetic variations are more susceptible or develop some protection against the disease (Gupta et al., 2018). One example of these genetic variations is the polymorphism in the IL6 gene at position -174 G > C (rs1800795), where there is an change of a guanine for a cytosine, that modifies the gene expression, resulting in plasmatic alterations of IL-6 with the possible influence on the clinical course of the dengue (Avendaño-Tamayo et al., 2017; Cansanção et al., 2016a; Feitosa et al., 2016). However the results remain contradictory.

Studies with meta-analytic approaches are considered as the top of scientific evidence to gather contrary results available on the literature, what researches by meta-analysis to detect the influence of distinct polymorphisms in cytokine genes and dengue are already performed before (Pabalan et al., 2018; Santos et al., 2020). Besides, that type of study may elucidate the association of genetic alterations with the dengue, what is the goal of the current researches because through this knowledge it is possible to better understand the mechanisms of pathogenesis with the developing of strategies with efficient therapeutic interventions to prevent the evolution of the disease to most severe forms. Therefore, this study aims to evaluate by means of a meta-analytic calculations the possible relation on the single nucleotide

Table 2
Distribution of genotype and allele frequencies across the included studies.

Genotype/Allele	Control N (%)	DWOS N (%)	DWWS N (%)
GG	318 (52.56)	232 (56.86)	72 (64.29)
GC	232 (38.35)	137 (33.58)	29 (25.89)
CC	55 (9.09)	39 (9.56)	11 (9.82)
G	868 (71.74)	601 (73.65)	173 (77.23)
C	342 (28.26)	215 (26.35)	51 (22.77)

N: amount of genotype or allele; DWOS: dengue without warning signs; DWWS: dengue with warning signs.

polymorphism (SNP) *IL6*-174 G > C (rs1800795) for susceptibility or protective role against dengue.

2. Materials and methods

2.1. Protocol

The meta-analysis followed the criteria proposed by Moher et al. (2009) in the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA).

2.2. Eligibility criteria

To be included in the meta-analysis, the studies had to fulfil the following criteria: (1) To be an original case-control study (2) To evaluate the association between the *IL6*-174 G/C polymorphism with dengue; (3) To have data regarding the complete genotypic frequency. (4) The case patients received the diagnosis of dengue by laboratory and clinical findings (the diagnosis for dengue fever is performed by specific clinical findings such as fever associated with headache, retro-orbital pain, myalgia, arthralgia, rash, leukopenia, nausea or vomiting, with laboratory confirmation through viral isolation techniques or antigen or antibody detection (WHO – World Health Organization, 1997). The diagnosis of cases with dengue hemorrhagic fever consists in the observation of finding as high fever or history of fever in the last 2–7 days, associated with bleeding tendencies, thrombocytopenia, variation in the size of the liver by 2 cm – 4 cm, evidence of plasma leakage conferred by increased hematocrit, can be confirmed by laboratory tests, such as viral isolation techniques and detection of antigen or antibody (WHO – World Health Organization, 1997). The diagnosis for dengue without warning signs is performed on the basis of findings as fever associated with two or more manifestations such as nausea, vomiting, rash, leukopenia, pain and aches, with laboratory confirmation through viral isolation techniques or antigen or antibody detection (WHO – World Health Organization, 2009). Finally, the diagnosis of cases with dengue with warning signs is made through clinical manifestations such as abdominal pain or tenderness, persistent vomiting, accumulation of clinical fluids, mucosal bleed, lethargy, restlessness, enlargement of the liver >2 cm, increase in hematocrit concomitant with rapid decrease in platelet count, can be confirmed by laboratory tests, such as viral isolation techniques and detection of antigen or antibody (WHO – World Health Organization, 2009). Articles that did not meet at least one of

these criteria were excluded.

2.3. Search strategy

The literature search was performed by two calibrated investigators for studies published before 05 September 2020. The databases used for the literature retrieve were: Google Scholar, MedLine, PubMed, Scielo, SCOPUS and Web of Science. The keywords used in the search for the studies were: “dengue”, “polymorphism”, “cytokine”, “interleukin”, “SNP”, “*IL6*”, “174 G/C” and “rs1800795”, combining them with the Boolean operators “AND” and “OR”. There was any language restriction and the references from the identified and eligible studies were screened for the identification of potential additional studies.

2.4. Data extraction

Two investigators (FRPS and ACTCP) in a independent-manner way extracted the data from the included studies following a standardized form composed by: name of the first author, year of publication, country in which the study was realized, sample size, control model, number of cases and control, genotyping method of the SNP *IL6*-174 G/C, genotype and allele frequency.

2.5. Evaluation of bias risk

The included studies were evaluated by New-Ottawa Scale (NOS) (Wells et al., 2014) for assessment of quality which the studies were

Table 4
Meta-analysis calculations of the *IL6* (–174 G/C) polymorphism with dengue between the DWOS group and the Control group.

DWOS vs. Control Genetic model	Frequency DWOS/ Control	Association test		Heterogeneity test		
		OR [CI 95%]	P*	I ²	P	EM
HOM (CC vs. GG)	37/42	1,12 [0,69–1,81]	0,65	27%	0,25	F
HEM (GC vs. GG)	126/207 74/173	0,76 [0,39–1,48]	0,41 0,001**	77% 0%	0,01 0,39	R F
REM (CC vs. GC + GG)	37/42	1,26 [0,78–2,02]	0,34	0%	0,57	F
DOM (CC + GC vs. GG)	163/249 101/211	0,82 [0,43–1,57]	0,54 0,004**	78% 28%	0,01 0,24	R F
ALM (C vs. G)	200/291 128/249	0,90 [0,56–1,46]	0,67 0,04**	75% 48%	0,02 0,17	R F

HOM: homozygous model; HEM: heterozygous model; REM: recessive model; DOM: dominant model; ALM: allelic model; OR: odds ratio; CI: confidence interval; P*: p-value to OR; I²: heterogeneity; P: p-value to I²; EM: effect model; R: random effect model; F: fixed effect model; **: significant value-p after excluding a study.

Table 3
Statistical significance value of the genotype and allele frequency when comparing case/control groups.

Genotype/Allele	DWOS vs Control		DWWS vs Control		DWWS vs DWOS	
	Frequency (%)	P	Frequency (%)	P	Frequency (%)	P
GG	56.86/52.56	0.1778	64.29/52.56	0.0221	64.29/56.86	0.1579
GC	33.58/38.35	0.1219	25.89/38.35	0.0119	25.89/33.58	0.1222
CC	9.56/9.09	0.8012	9.82/9.09	0.8060	9.82/9.56	0.9335
G	73.65/71.74	0.3433	77.23/71.74	0.0902	77.23/73.65	0.2766
C	26.35/28.26	0.3433	22.77/28.26	0.0902	22.77/26.35	0.2766

DWOS: dengue without warning signs; DWWS: dengue with warning signs; P: p-value to X².

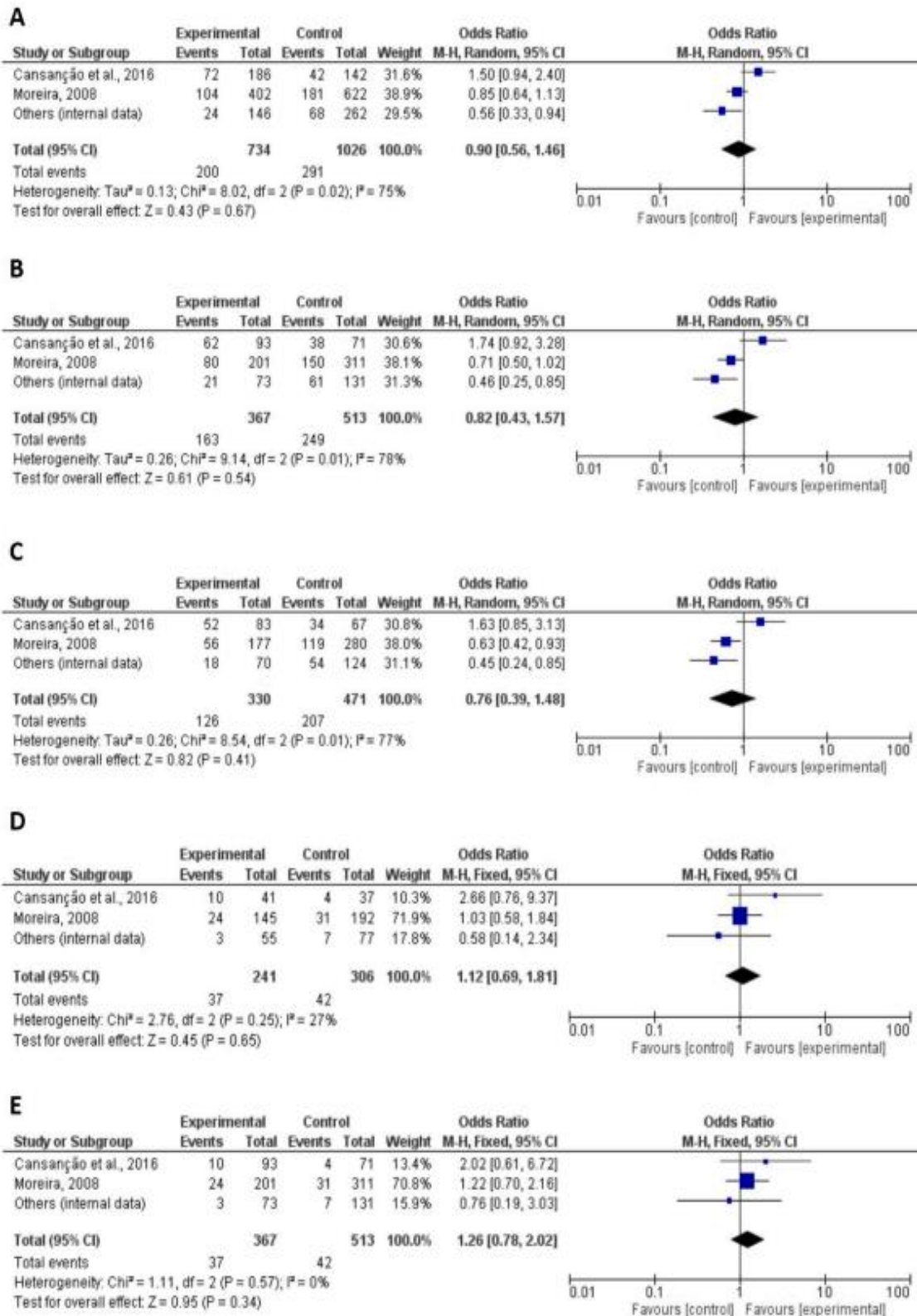


Fig. 2. Forest plot of comparison between the groups DWOS versus Control for the mutant allele versus the wild type allele (A), the homozygous mutant genotype plus heterozygous genotype versus homozygous wild type genotype (B), the heterozygous genotype versus homozygous wild type genotype (C), the homozygous mutant genotype versus homozygous wild type genotype (D) and comparing the homozygous mutant genotype versus heterozygous genotype plus homozygous wild type genotype (E) in the rs1800795 polymorphism in IL6 gene and dengue.

Table 5
Meta-analysis calculations of the IL-6 (-174 G/C) polymorphism with dengue between the DWWS group and the Control group.

DWWS vs. Control Genetic model	Frequency DWWS/Control	Association test		Heterogeneity test		
		OR [CI 95%]	P*	I ²	P	EM
HOM (CC vs. GG)	9/20	0,99 [0,42–2,35]	0,98	0%	0,60	F
HEM (GC vs. GG)	24/79	0,72 [0,41–1,25]	0,24	0%	0,39	F
REM (CC vs. GC + GG)	9/20	1,07 [0,46–2,49]	0,87	0%	0,73	F
DOM (CC + GC vs. GG)	33/99	0,77 [0,46–1,28]	0,31	8%	0,30	F
ALM (C vs. G)	42/119	0,86 [0,57–1,29]	0,46	12%	0,29	F

HOM: homozygous model; HEM: heterozygous model; REM: recessive model; DOM: dominant model; ALM: allelic model; OR: odds ratio; CI: confidence interval; P*: p-value to OR; I²: heterogeneity; P: p-value to I²; EM: effect model; R: random effect model; F: fixed effect model.

analyzed in the methodological aspects of selection, comparability and exposure receiving scores. Studies with score < 7 were excluded.

2.6. Statistical analysis

From the tabulated data, healthy individuals or individuals with a negative diagnosis for DENV infection constituted the Control group, patients positive for dengue without warning signs integrated the DWOS group, and patients diagnosed with dengue with warning signs formed the DWWS group. In the meta-analysis between the groups, there was a comparison in three genetic models: allelic model (C versus G), homozygous (CC versus GG), heterozygous (GC versus GG). To evaluate the importance of the heterozygous genotype, the recessive model (CC versus GC + GG) and the dominant model (CC + GC versus GG) were analyzed.

Statistical analysis was performed using Review Manager v.5.3 (RevMan, Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2012) to calculate the OR with significance ($p < 0.05$), associating the rs1800795 polymorphism with susceptibility or protection to dengue. In the observation of this significance, the results of the chi-square test were analyzed based on the Q test to verify the presence of heterogeneity (I²). When comparisons showed the presence of statistically non-significant heterogeneity (I² < 50%, $P_{\text{heterogeneity}} > 0.05$), a fixed effect model (FE) was used to estimate the OR value. In comparisons where heterogeneity was statistically significant (I² > 50%, $P_{\text{heterogeneity}} < 0.05$), the random effect model (RE) was used to estimate the OR value.

When the value of I² was >50%, studies that caused heterogeneity were excluded, thus leaving the analyzed studies less heterogeneous (I² < 50%). OR values were calculated in 95% confidence interval (CI), and these allow the association of the polymorphism with protection or susceptibility to dengue. The result of all comparisons is considered statistically significant when $p < 0.05$.

The BioEstat 5.3 (Belém, PA, Brazil, 2012) was used to determine significant differences when comparing allele and genotype frequencies. The chi-square test (χ^2) was used to evaluate the occurrence of this significance, considering a significant difference with $p < 0.05$.

To detect publication bias, the funnel plot graphs and the Begg and Egger test were analyzed through the Comprehensive-Meta Analysis software v.3 (CMA) (2014).

3. Results

The systematic search has identified 4700 papers and after the steps of screening and eligibility, four studies (Cansanção et al., 2016a;

Fernández-Mestre et al., 2004; Moreira et al., 2008; Perez et al., 2010) met the inclusion criteria and were included in the meta-analysis. The meta-analysis was performed with data from the included articles and with one additional study obtained by complementary search (Queiroz et al., 2020 (Fig. 1). The studies reached more than 7 points in the NOS as showed in Table 1.

The studies included in this meta-analysis that did not adopt the clinical classification established by the World Health Organization in 2009 (WHO – World Health Organization, 2009) for dengue, dividing their groups as DF and DHF according to the WHO criteria in 1997 (WHO – World Health Organization, 1997), had their data tabulated as DWOS for individuals diagnosed with DF and DWWS for individuals diagnosed with DHF. According to the new categorization of dengue by WHO in 2009, the SD are extreme cases, which cannot be confused with DHF in this meta-analysis.

The sum of the data resulted in 605 volunteer individuals which constituted the control group, 408 patients with dengue without warning signs (DWOS) forming the DWOS group and 112 patients with dengue with warning signs (DWWS) constituting the DWWS group. It is worth mentioning that not all articles selected for this study have the three groups (control, DWOS and DWWS). The study by Cansanção et al. (2016a) and Moreira et al. (2008) have the control group and the DWOS group. The study by Perez et al. (2010) carried out the association of SNP rs1800795 with dengue comparing the control group and the DWWS group. The study by Fernández-Mestre et al. (2004) has the three possible groups, however in it there is only the genotypic frequency of the DWOS group and the DWWS group due not having found significant results with the participation of the control group, occurring comparison between the groups to infection by DENV. Finally, the data from the case-control study of the present researchers, performed in our Laboratory of Biology of Microorganisms (BIOMIC) (Queiroz et al., 2020) has information regarding the three groups (Table 1).

Table 2 shows the distribution of the genotype and allele frequency after unifying the data from all articles participating in this study. Table 3 shows the analysis of the genotype and allele frequencies between the case/control groups. The chi-square test (χ^2) analyzed whether the frequencies presented statistically significant differences ($p < 0.05$) between the groups. The GG genotype was significantly more frequent in the DWWS group ($p = 0.0221$). The GC genotype was more prevalent in the control group ($p = 0.0119$) (Table 3).

In this meta-analysis, we evaluated the association the IL6-174 G/C polymorphism with dengue through genotypic and allele frequencies involving only studies that contained the same groups in their analyzes. Thus, when comparing the genotypes between the DWOS group and the control group, three studies were selected (Cansanção et al., 2016a; Moreira et al., 2008; Queiroz et al., 2020) due to the authors comparing the DWOS group with the Control group in their analyzes, totaling 880 participants (367 cases and 513 controls). Similarly, in the comparison with the DWWS group and the control group, two studies were involved (Perez et al., 2010; Queiroz et al., 2020), with a total of 310 participants (87 cases and 223 controls). Finally, in the analysis with the DWWS group and the DWOS group, two studies were integrated (Fernández-Mestre et al., 2004; Queiroz et al., 2020), totaling 183 participants (69 with DWWS and 114 with DWOS).

The results regarding the meta-analysis of the DWOS vs. control are shown in Table 4, where it is observed that in the heterozygous model, the GC genotype is associated with protection against DWOS (OR = 0.57, CI = 0.41–0.80, $p = 0.001$, I² = 0%, $P_{\text{heterogeneity}} = 0.39$) (Fig. 2). The analysis with the dominant model (CC + GC vs. GG) showed that it is associated with protection against DWOS (OR = 0.63, CI = 0.47–0.86, $p = 0.004$, I² = 28%, $P_{\text{heterogeneity}} = 0.24$). In addition to these results, the comparison in the allelic model showed that the polymorphic allele C is associated with protection against DWOS (OR = 0.77, CI = 0.60–0.99, $p = 0.04$, I² = 48%, $P_{\text{heterogeneity}} = 0.17$). However, in the homozygous (CC vs. GG) and recessive (CC vs. GC + GG) model, the ORs of the associations suggest that the CC genotype increases the chances that the

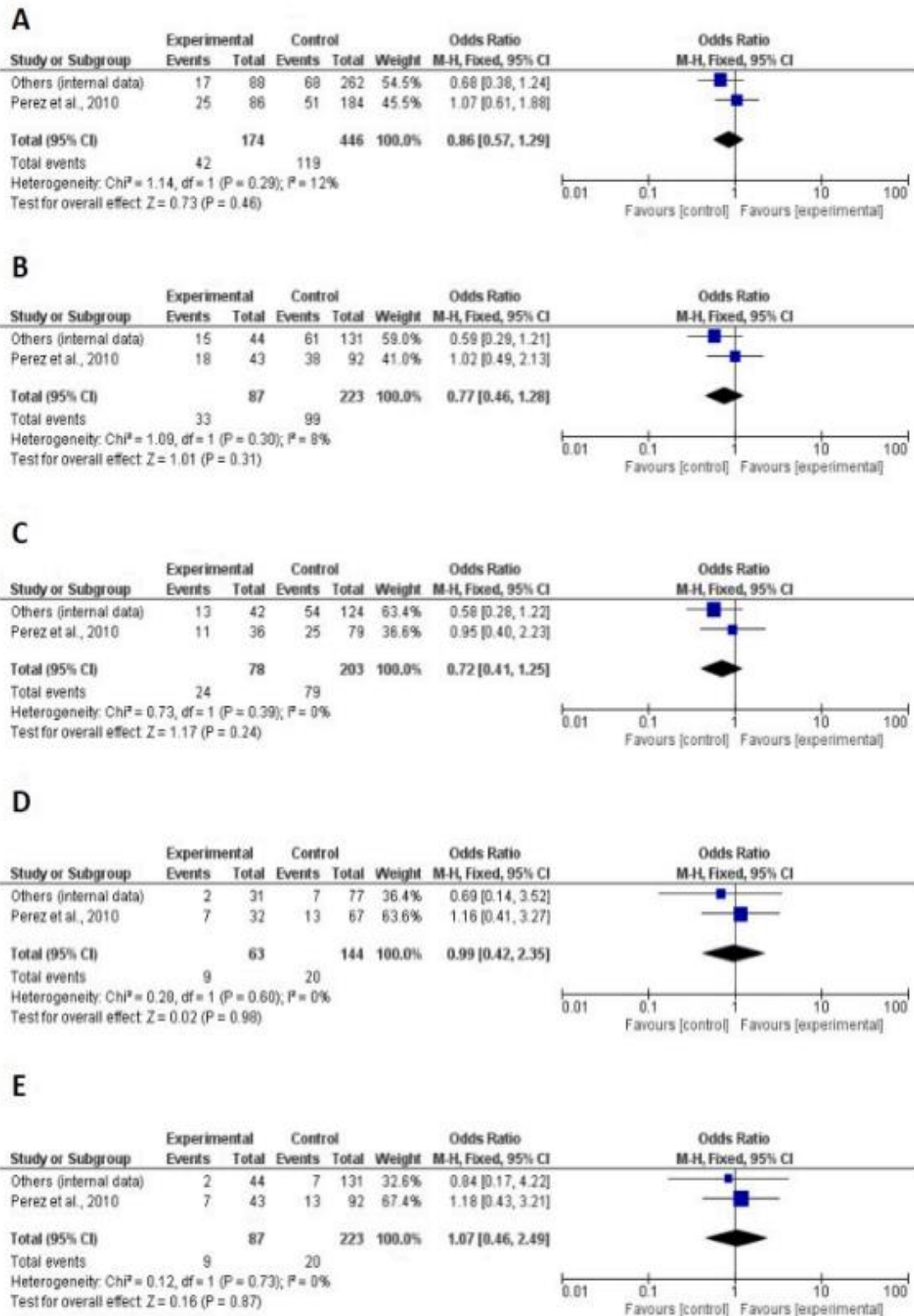


Fig. 3. Forest plot of comparison between the groups DWWS versus Control for the mutant allele versus the wild type allele (A), the homozygous mutant genotype plus heterozygous genotype versus homozygous wild type genotype (B), the heterozygous genotype versus homozygous wild type genotype (C), the homozygous mutant genotype versus homozygous wild type genotype (D) and comparing the homozygous mutant genotype versus heterozygous genotype plus homozygous wild type genotype (E) in the rs1800795 polymorphism in IL6 gene and dengue.

Table 6
Meta-analysis calculations of the IL-6 (-174 G/C) polymorphism with dengue between the DWWS group and the DWOS group.

Genetic model	Frequency DWWS/DWOS	Association test		Heterogeneity test		
		OR [CI 95%]	P*	I ²	P	EM
HOM (CC vs. GG)	4/5	1,35 [0,34–5,28]	0,67	0%	0,85	F
HEM (GC vs. GG)	18/29	1,06 [0,53–2,10]	0,88	0%	0,42	F
REM (CC vs. GC + GG)	4/5	1,34 [0,35–5,18]	0,67	0%	0,76	F
DOM (CC + GC vs. GG)	22/34	1,10 [0,58–2,10]	0,77	0%	0,54	F
ALM (C vs. G)	26/39	1,12 [0,65–1,95]	0,67	0%	0,71	F

HOM: homozygous model; HEM: heterozygous model; REM: recessive model; DOM: dominant model; ALM: allelic model; OR: odds ratio; CI: confidence interval; P*: p-value to OR; I²: heterogeneity; P: p-value to I²; EM: effect model; R: random effect model; F: fixed effect model.

individual is susceptible to this disease, but the results were not significant (OR = 1.12, CI = 0.69–1.81, $p = 0.65$, $I^2 = 27\%$, $P_{\text{heterogeneity}} = 0.25$) and (OR = 1.26, CI = 0.78–2.02, $p = 0.34$, $I^2 = 0\%$, $P_{\text{heterogeneity}} = 0.57$), respectively.

The recessive model and the dominant model were evaluated to determine the importance of the heterozygous genotype (GC). When analyzing the heterozygous genotype together with the polymorphic homozygous genotype (dominant model), considering that the variant allele is dominant, the SNP was associated with protection against DWOS. However, when they were analyzed separately (recessive model), considering that the polymorphic allele is recessive, the CC genotype was associated with susceptibility. Thus, it is noted that in the analysis of both genetic models, the GC genotype was associated with protection against DWOS, confirming the result of the analysis of the heterozygous model.

In the comparison in the heterozygous, dominant and allelic models the DWOS group versus the control group, three studies were included. Due to one of these studies increasing heterogeneity, it was excluded from the comparison (Cansanção et al., 2016a), which besides leaving the studies less heterogeneous, the association between the two remaining studies (Queiroz et al., 2020; Moreira et al., 2008) showed statistically significant results ($p < 0.05$) (Table 4).

Although the other comparisons (DWWS vs. Control; DWWS vs. DWOS) there were not significant results, the OR values in the comparison DWWS vs. Control indicate that the heterozygous genotype (OR = 0.72, CI = 0.41–1.25, $p = 0.24$, $I^2 = 0\%$, $P_{\text{heterogeneity}} = 0.39$) and the variant C allele (OR = 0.86, CI = 0.57–1.29, $p = 0.46$, $I^2 = 12\%$, $P_{\text{heterogeneity}} = 0.29$) are associated with protection, as seen in the comparison DWOS vs. Control, but without significance (Table 5 and Fig. 3). Comparisons between the genotypes of the DWWS group with the control group, and of the DWWS group with the DWOS group, are shown in Table 5, Table 6 and Fig. 4, respectively.

The Begg's and Egger's tests were calculated and the results indicated that there were no evidence of publication bias validating our results (Table S1). In addition, any obvious asymmetry was detected by funnel plot graphic (Fig. S1).

4. Discussion

Cytokines are molecules that act modulating pathological processes. Therefore, during the pathological process of dengue, the quantity of cytokines is altered, being at high or low levels, which influences the severity of the disease (Avendaño-Tamayo et al., 2017).

Interleukin 6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine, has pro-inflammatory activity, and when its expression is deregulated it implies in several pathological processes and in the development of several diseases

(Jordan et al., 2017; Schett, 2018; Souza et al., 2008; Tanaka et al., 2016). This molecule has participation in the immune and in the vascular systems, as well as in other biological processes (Schett, 2018; Lyu et al., 2019). IL-6 acts in the differentiation of monocytes into macrophages, promotes the release of vascular endothelial growth factor (VEGF), which induces angiogenesis, favoring the increase of the vascular permeability (Bates et al., 2002; Park et al., 2019; Schett, 2018).

In DENV infection the modulation of cytokines is altered and this imbalance is involved to the appearance of symptoms characteristic of the disease (Cansanção et al., 2016b). Therefore, the study of polymorphisms in genes of cytokines is of fundamental importance to find patterns in the production of these elements, because depending of the amount of these circulating products in the organism, favors the appearance of symptoms, as well as providing the advance or regression of disease (Avendaño-Tamayo et al., 2017; Feitosa et al., 2016).

The IL6 gene is located at chromosome 7p21.24. The SNP IL6-174 G > C consists in the shift of from a guanine for a cytosine, modulating the production of IL-6 (Dettogni et al., 2015; Fishman et al., 1998; Ji et al., 2019; Pieroni et al., 2007; Tetzlaff et al., 2018). There are not many studies in the literature that associate polymorphism in the IL6 gene at the -174 G > C position with dengue, which limited our analysis.

In the study performed by Cansanção et al. (2016a) in the north-eastern region of Brazil, when analyzing the IL6-174 G/C polymorphism singly, there were not found significant results that indicate protection or susceptibility to dengue. However, in our study, we found that the GC genotype of the rs1800795 SNP is associated with protection against DWOS (Table 4), which is in accordance with Moreira et al. (2008) and Queiroz et al. (2020), who associated the GC genotype of the -174 G/C polymorphism in the IL6 gene with protection against DWOS (OR = 0.62 [0.42–0.91], $p = 0.015$) (OR = 0.45 [0.24–0.85], $p = 0.013$), respectively.

Although the present study did not analyze the plasmatic level of IL-6, it is estimated to have a relationship between the genotype and the expression of the IL6 gene. In the study by Moreira et al. (2008), the author suggests that rs1800795 genetic polymorphism is associated with increased production of IL-6, contradicting some studies, such as by Cansanção et al. (2016a), Dettogni et al. (2015), Fernández-Real et al. (2000) and Pieroni et al. (2007), and, which support the concept that this polymorphism is related to the decrease in the expression of the IL6 gene, resulting in a reduction in the plasmatic concentration.

There is a consensus that the polymorphic C allele is associated with low expression of the IL6 gene, resulting in a decreased level of IL-6 in the plasma (Fishman et al., 1998; Pieroni et al., 2007; Tetzlaff et al., 2018). In the present study, the analysis between alleles C and G, demonstrated that the variant allele is related to protection against DWOS (Table 4), which is in accordance with Queiroz et al. (2020), who also associated the polymorphic allele C with the protection against DWOS ($p = 0.027$). Thus, it is inferred that reduced amounts of IL-6 would have a positive impact against the development of DWOS. However, it cannot be said that carriers of two polymorphic alleles (CC) are strongly protected against the development of this disease. According to our results, in the analysis of the homozygous model, the homozygous variant genotype was associated with the risk for DWOS, but there was not significance in this comparison (Table 4).

In the study of Perez et al. (2010), carried out in Cuba, when analyzing the allelic and genotypic distribution of the SNP -174 G > C between the DWWS group and the control group, noted that there was not significant difference. As well as Fernández-Mestre et al. (2004) in their study performed in Venezuelan patients, revealed that there is an allelic and genotypic distribution without statistically significant difference between patients with DWWS and DWOS. In contrast, our results show that there is a significant difference in the frequency of the GG genotype between the DWWS group and the control group, with a greater number of patients with this genotype in the DWWS group ($p = 0.0221$) (Table 3). In addition, we also found that the heterozygous

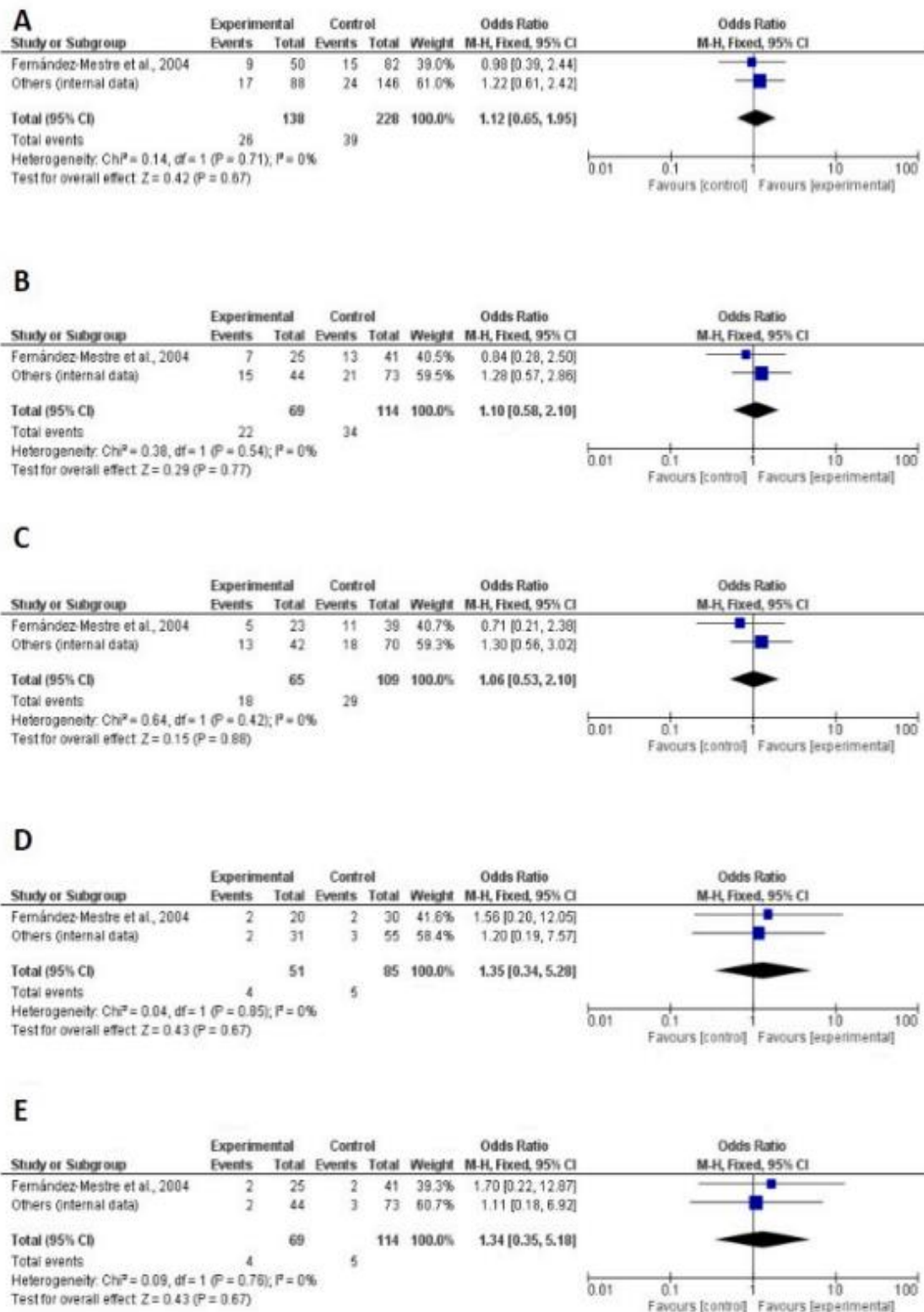


Fig. 4. Forest plot of comparison between the groups DWWS versus DWOS for the mutant allele versus the wild type allele (A), the homozygous mutant genotype plus heterozygous genotype versus homozygous wild type genotype (B), the heterozygous genotype versus homozygous wild type genotype (C), the homozygous mutant genotype versus homozygous wild type genotype (D) and comparing the homozygous mutant genotype versus heterozygous genotype plus homozygous wild type genotype (E) in the rs1800795 polymorphism in IL6 gene and dengue.

genotype is more frequent in individuals in the control group ($p = 0.0119$) than in individuals in the DWWS group (Table 3).

These results can be explained based on previous data in the literature. Since IL-6 promotes increased vascular permeability by VEGF induction, and the G allele is associated with higher plasmatic levels of this cytokine, because it is a stronger transcription activator than the C allele, the latter being related to low IL-6 production (Bates et al., 2002; Dettogni et al., 2015; Fernández-Real et al., 2000; Fishman et al., 1998; Pieroni et al., 2007; Schett, 2018; Tetzlaff et al., 2018). Therefore, it is plausible to agree that there will be a lower frequency of the heterozygous genotype and a higher frequency of the wild genotype (GG) in the DWWS group, due to the fact that this wild genotype is associated with a high level of IL-6 in the plasma promoting leakage of liquids by increasing vascular permeability, which is a characteristic of DWWS. In addition, it is possible to correlate these data with some studies that report that higher plasmatic levels of IL-6 were observed in cases of DWWS (Iani et al., 2016; Hernández et al., 2016; Kurane, 2007).

In DWOS, at the beginning of DENV infection, IL-6 promotes viral eradication by the activation of the Th1 immune response, and if this eradication does not occur and the disease progresses to DWWS, the response immunological Th1 in DWOS becomes Th2 in DWWS, and it is in this response that the levels of IL-6 tend to increase, may associate the abundant IL-6 levels in the progression of DWWS (Chaturvedi et al., 2000; Chen et al., 2008; Hernández et al., 2016; Masood et al., 2018; Moreira et al., 2008). Furthermore, the increased expression of IL-6 may affect the functions of Th1 cells and CD8 + T cells, favoring viral persistence (Hou et al., 2014; Salinas et al., 2019).

Severe forms of DENV infection there is an imbalance of the inflammatory process (Cansanção et al., 2016b). The IL-6 can promote the production of antiplatelet and tissue plasminogen activator, which will cause a deficient coagulation, resulting in plasma leakage and bleeding (Iani et al., 2016). Thus, the SNP IL6-174 G > C reduces these occurrences, considering that there is a lower production of IL-6. It is worth mentioning that there are other cytokines and other factors, such as environmental factors, that can influence the pathogenesis of dengue (Hernández et al., 2016). The imbalance in the levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines is related to the appearance of symptoms, due to a pro-inflammatory response without an efficient anti-inflammatory regulation (Iani et al., 2016). The use of cytokine antagonists is an alternative of therapeutic intervention, seeking to reduce the characteristic manifestations of dengue or preventing the disease to become more severe (Patro et al., 2019).

Even though our results have shown that the rs1800795 polymorphism is associated with protection against DWOS, it is relevant to highlight that there are other cytokines and other polymorphisms that act on the expression of the IL-6 gene, changing the circulating amount of this cytokine, which implies in the activation of several immunopathological mechanisms leading to different outcomes of the disease (Cahill et al., 2018; Hernández et al., 2016; Useche et al., 2018).

Although this current meta-analysis brouth relevant new data on the association between the aforementioned polymorphism in IL6 gene and dengue risk, some limitations should be noted and discussed. First, we compared a group of healthy individuals with a negative diagnosis for dengue with a group of subjects positive for dengue. However, the performance of studies comparing individuals infected by DENV, but asymptomatic, would be an alternative to seek an understanding of the behavior of this polymorphism with the symptoms of the disease, establishing whether it is strongly associated or not with dengue. Therefore, it is necessary to carry out more studies that correlate this polymorphism with dengue, aiming to seek a better understanding of its relationship with the susceptibility or protection for this disease. Second, the broad spectrum of clinical manifestations of dengue may be a challenge in cross-sectional genetic studies carrying out increased bias risk in the data, specially when take in consideration unusual clinical manifestations of the disease that confounder the researches (Esfolete et al., 2019). Third, the influence of ethnicity on genetic polymorphisms

frequency and their role in infectious disease are preponderant and must be considered in meta-analysis studies. However, the limited data available on the literature did not allow a complete ethnical evaluation what may be represent a potential source of bias. Fourth, the evaluation of other genetic variations in haplotype forms with the rs1800795 polymorphism may clarify the exact role of this genetic alteration in dengue; future studies should focus in to evaluate the combination of other SNP's in IL6 gene as haplotypes and the disease.

5. Conclusions

The analysis showed that the GC heterozygous genotype of SNP rs1800795 has a protective role with the C allele variant against dengue without warning signs (DWOS). It was noted that the GC genotype was more present in the Control group when compared the genotype distributions between the DWWS and Control groups, and the GG genotype is more frequent in the DWWS group, indicating a possible relationship of the wild type genotype to DWWS. Futhers researches are required to validate our results.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104778>.

Sources of funding

This work was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Piauí [Edital FAPEPI/MS-DECIT/CNPq/SESAPI N° 002/2016 – PPSUS]; Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) 14/2014 (grant number 4567072014-0), L.A.A.F were recipients of undergraduate students from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - PIBIC).

References

- Avendaño-Tamayo, E., Campo, O., Chacón-Duque, J.C., Ramírez, R., Rojas, W., Agudelo-Florez, P., Bedoya, G., Restrepo, B.N., 2017. Variants in the TNFA, IL6 and IFNG genes are associated with the dengue severity in a sample from Colombian population. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud* 37, 486–497. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i4.3305>.
- Bates, D.O., Hillman, N.J., Pocock, T.M., Neal, C.R., 2002. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J. Anat.* 200, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00047.19.x>.
- BRAZIL. Ministry of Health, 2013. Dengue: Diagnosis and Clinical Management: Adult and Child, fourth ed. Brasília, Federal District.
- BRAZIL. Ministry of Health, 2016. Dengue: Diagnosis and Clinical Management: Adult and Child, fifth ed. Brasília, Federal District.
- BRAZIL. Ministry of Health, 2017. Health Surveillance Guide: Single Volume, second ed. Brasília, Federal District.
- Cahill, M.E., Conley, S., Dewan, A.T., Montgomery, R.R., 2018. Identification of genetic variants associated with dengue or West Nile virus disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 18, 282. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3186-6>.
- Cansanção, I.F., do Carmo, A.P.S., Leite, R.D., Portela, R.D.P., Paiva Junior, S.S.L., Balbino, V.Q., Rabenhorst, S.H.B., 2016a. Association of genetic polymorphisms of IL1β -511 C>T, IL1RN VNTR 86 bp, IL6-174 G>C, IL10-819 C>T and TNFα -308 G>A, involved in symptomatic patients with dengue in Brazil. *Inflamm. Res.* 65, 925–932. <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0975-5>.
- Cansanção, I.F., do Carmo, A.P.S., Leite, R.D., Rabenhorst, S.H.B., 2016b. Association of Polymorphisms in IL1β -511C>T, IL1RN 86bp VNTR, and IL6-174G>C Genes with Clinical Dengue Signs and Symptoms in Brazilian Dengue Patients. *Viral Immunol.* 29, 372–376. <https://doi.org/10.1089/vim.2015.0082>.
- Chaturvedi, U.C., Agarwal, R., Elbishi, E.A., Mustafa, A.S., 2000. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28, 183–188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01474.x>.
- Chen, J., Ng, M.M.L., Chu, J.J.H., 2008. Molecular profiling of T-helper immune genes during dengue virus infection. *Virology* 475, 165. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.11.016>.
- Chen, J., Ng, M.M.L., Chu, J.J.H., 2015. Activation of TLR2 and TLR6 by dengue NS1 protein and its implications in the immunopathogenesis of dengue virus infection. *PLoS Pathog.* 11, e1005053. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005053>.
- Colombo, T.E., Vedovello, D., Pacca-Mazaro, C.C., Mondini, A., Araújo Jr., J.A., Cabreria, E., Lopes, J.C., Santos, I.N.P., Reis, A.F.N., Costa, F.R., Cruz, L.E.A.A., Ferreira Jr., J., Rocha, E.S.O., Kroon, E.G., Bronzon, R.V.M., Vasiliadis, N., Nogueira, M.L., 2016. Dengue virus surveillance: detection of DENV-4 in the city of São José do Rio Preto, SP, Brazil. *Acta Trop.* 164, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.004>.

- Dettoni, R.S., Tristão-Sá, R., dos Santos, M., da Silva, F.F., Louro, L.D., 2015. Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons. *Hum. Immunol.* 76, 717–723. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.09.026>.
- Esólete, C.F., Mota, M.T.O., Terzian, A.C.B., Milhlm, B.H.G.A., Ribeiro, M.R., Nunes, D.V., Mourão, M.P., Rossi, S.L., Nogueira, M.L., Vasiliak, N., 2019. Unusual clinical manifestations of dengue disease – real or imagined? *Acta Trop.* 199, 105134. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105134>.
- Feitosa, R.N.M., Vallinoto, A.C.R., Vasconcelos, P.F.C., Azevedo, R.S.S., Azevedo, V.N., Machado, L.F.A., Lima, S.S., Ishak, M.O.G., Ishak, R., 2016. Gene polymorphisms and serum levels of pro- and anti-inflammatory markers in dengue viral infections. *Viral Immunol.* 29, 379–388. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0026>.
- Fernández-Mestre, M.T., Gendekhadze, K., Rivas-Vetencourt, P., Layrisse, Z., 2004. TNF- α -308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens* 64, 469–472. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2004.00304.x>.
- Fernández-Real, J.M., Broch, M., Richart, J.V.C., Ricart, W., 2000. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 1334–1339. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.6.555>.
- Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J.S., Humphries, S., Woo, P., 1998. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest.* 102, 1369–1376. <https://doi.org/10.1172/JCI2629>.
- Gupta, S., Agarwal, A., Biswas, D., 2018. Host genetic polymorphisms influencing susceptibility to dengue. *DNA Cell Biol.* 37, 805–807. <https://doi.org/10.1089/dna.2018.4372>.
- Hernández, S.L.C., Guardo, H.N.P., Aguilar, H.F., Mateos, S.G., Martínez, I.L., Navarrete, V.O., Ludert, J.E., Angel, R.M., 2016. Primary dengue virus infections induce differential cytokine production in Mexican patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 111, 161–167. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150359>.
- Hou, W., Jin, Y.H., Kang, H.S., Kim, B.S., 2014. Interleukin-6 (IL-6) and IL-17 synergistically promote viral persistence by inhibiting cellular apoptosis and cytotoxic T cell function. *J. Virol.* 88, 8479–8489. <https://doi.org/10.1128/JVI.00724-14>.
- Iani, F.C.M., Caldas, S., Duarte, M.M., Cury, A.L.F., Cecilio, A.B., Costa, P.A.C., Antonelli, L.R., Gollob, K.J., 2016. Dengue patients with early hemorrhagic manifestations lose coordinate expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 with the inflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95, 193–200. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0537>.
- Ji, Y.F., Jiang, X., Li, W., Ge, X., 2019. Impact of interleukin-6 gene polymorphisms and its interaction with obesity on osteoporosis risk in Chinese postmenopausal women. *Environ. Health Prev. Med.* 24, 48. <https://doi.org/10.1186/s12199-019-0803-y>.
- Jordan, S., Choi, J., Kim, I., Wu, G., Toyoda, M., Shin, B., Vo, A., 2017. Interleukin-6, a cytokine critical to mediation of inflammation, autoimmunity and allograft rejection. *Transplantation*. 101, 32–44. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001452>.
- Kurane, I., 2007. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.05.010>.
- Luna, E.J.A., Figueiredo, G.M., Levi, J.E., Campos, S.R.L.C., Felix, A.C., Santiago e Souza, N., Figueiredo, W.M., Costa, A.A., Cardoso, M.R.A., Pannuti, C.S., 2020. A cohort study to assess the incidence of dengue, Brazil, 2014–2018. *Acta Trop.* 204, 105313. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105313>.
- Lyu, X., Zhang, M., Li, G., Cai, Y., Li, G., Qiao, Q., 2019. Interleukin-6 production mediated by the IRE1-XBP1 pathway confers radioresistance in human papillomavirus-negative oropharyngeal carcinoma. *Cancer Sci.* 110, 2471–2484. <https://doi.org/10.1111/cas.14094>.
- Masood, K.I., Jamil, B., Rahim, M., Islam, M., Farhan, M., Hasan, Z., 2018. Role of TNF α , IL-6 and CXCL10 in Dengue disease severity. *Iran. J. Microbiol.* 10, 202–207.
- Mohr, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D.G., The PRISMA Group, 2009. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.* 6, e1000097. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.
- Moreira, S.T., Cardoso, D.M., Visentainer, J.E., Fonzar, U.J.V., Moliterno, R.A., 2008. The possible protective role of the IL6-174GC genotype in dengue fever. *Open Trop. Med. J.* 1, 87–91. <https://doi.org/10.2174/1874315300801010087>.
- Pabalan, N., Chaisri, S., Tabunhan, S., Phumyen, A., Jarjanazi, H., Steiner, T.S., 2018. Associations of DC-SIGN (CD209) promoter –336 G/A polymorphism (rs4804803) with dengue infection: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* 177, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.017>.
- Park, Y.T., Lee, S.M., Kou, X., Karabucak, B., 2019. The role of interleukin 6 in osteogenic and neurogenic differentiation potentials of dental pulp stem cells. *J. Endod.* 45, 1342–1348. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.08.002>.
- Patra, G., Mallik, S., Saha, B., Mukhopadhyay, S., 2019. Assessment of chemokine and cytokine signatures in patients with dengue infection: a hospital-based study in Kolkata, India. *Acta Trop.* 190, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.10.017>.
- Patro, A.R.K., Mohanty, S., Prusty, B.K., Singh, D.K., Galkwad, S., Saswat, T., Chattopadhyay, S., Das, B.K., Tripathy, R., Ravindran, B., 2019. Cytokine signature associated with disease severity in dengue. *Viruses*. 11, 34. <https://doi.org/10.3390/v11010034>.
- Perez, A.B., Sierra, B., Garcia, G., Aguirre, E., Babel, N., Alvarez, M., Sanchez, L., Valdes, L., Volk, H.D., Guzman, M.G., 2010. Tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: Implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum. Immunol.* 71, 1135–1140. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.08.004>.
- Pieroni, F., Lourenço, D.M., Morelli, V.M., Maffei, F.H., Zago, M.A., Franco, R.F., 2007. Cytokine gene variants and venous thrombotic risk in the BRATROS (BRAZILIAN THROMBOSIS STUDY). *Thromb. Res.* 120, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2006.09.015>.
- Queiroz, J.L., Maciel, M.S.C., Teles, L.S., Vieira, S.M.A., Gomes, T.N., Fernandes, H.F., Oliveira, J.S., Ferreira, G.P., Pereira, A.C.T.C., 2020. Prevalence and influence of polymorphism –174 G/C of the IL-6 gene in association with dengue and chikungunya in Northeast Brazil patients. *Viral Immunol.* [under review].
- Salinas, L.V., Rodriguez, A.V., Rodriguez, L.L., Borca, M.V., 2019. The role of interleukin 6 during viral infections. *Front. Microbiol.* 10, 1057. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01057>.
- Santos, N.C., Gomes, T.N., Góis, L.A.F., Oliveira, J.S., Coelho, L.F.L., Ferreira, G.P., Silva, F.R.P., Pereira, A.C.T.C., 2020. Association of single nucleotide polymorphisms in TNF- α (–308 G/A and –238 G/T) to dengue: case control and meta-analysis study. *Cytokine*. 134, 155183. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155183>.
- Schett, G., 2018. Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. *Rheumatology* 57. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex513> ii43–ii50.
- Souza, J.R.M., Oliveira, R.T., Blotta, M.H.S.L., Coelho, O.R., 2008. Serum levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18) and C-reactive protein (CRP) in patients with type-2 diabetes and acute coronary syndrome without ST-segment elevation. *Arq. Bras. Cardiol.* 90, 94–99. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2008000200004>.
- Tanaka, T., Nakanishi, M., Kishimoto, T., 2016. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. *Immunotherapy*. 8, 959–970. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0020>.
- Tetzlaff, W.F., Meroño, T., Botta, E.E., Martín, M.E., Sorroche, P.B., Boero, L.E., Castro, M., Frechtel, G.D., Rey, J., Daruich, J., Cerrone, G.E., Brites, F., 2018. –174 G>C IL-6 polymorphism and primary iron overload in male patients. *Ann. Hematol.* 97, 1683–1687. <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3333-6>.
- Useche, Y.M., Alves, M.R., Restrepo, B.N., Salgado, D.M., Narváez, C.F., Campo, O., Avendaño, E., Martínez, C., Chacon-Duque, J.C., Bedoya, G., 2018. Single-nucleotide polymorphisms in NOD1, RIPK2, MYD88, IL1R1, TNF, and IL1RN genes associated with symptomatic dengue in children from Colombia. *Viral Immunol.* 31, 613–623. <https://doi.org/10.1089/vim.2018.0028>.
- Vikram, K., Nagpal, B.N., Pande, V., Srivastava, A., Saxena, R., Anvikar, A., Das, A., Singh, H., Anushita, Gupta, S.K., Tuli, N.R., Telle, O., Yadav, N.K., Valecha, N., Paul, R., 2016. An epidemiological study of dengue in Delhi, India. *Acta Trop.* 153, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.025>.
- Warkentin, T., Pavlicek, R., 2016. Dengue fever: historical perspective and the global response. *J. Infect. Dis. Epidemiol.* 2 (15). <https://doi.org/10.23937/2474-3658/1510015>.
- Wells, G.A., et al., 2014. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for Assessing the Quality of Nonrandomized Studies in Meta-Analyses. Available at: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp.
- WHO – World Health Organization, 1997. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, second ed. Switzerland, Geneva.
- WHO – World Health Organization, 2009. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva, Switzerland.
- Yen, T.-Y., Santos, M.J.T., Tseng, L.-F., Chang, S.-F., Cheng, C.-F., Carvalho, A.V.A., Shu, P.-Y., Lien, J.-C., Tsai, K.-H., 2016. Seroprevalence of antibodies against dengue virus among pregnant women in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe. *Acta Trop.* 155, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.012>.