

ARTÍCULO ORIGINAL

Variantes en los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG* asociadas con la gravedad del dengue en una muestra de población colombiana

Efrén Avendaño-Tamayo^{1,2}, Omer Campo¹, Juan Camilo Chacón-Duque¹, Ruth Ramírez³, Winston Rojas¹, Piedad Agudelo-Florez⁴, Gabriel Bedoya¹, Berta Nelly Restrepo³

¹ Grupo de Genética Molecular, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Departamento de Ciencias Básicas, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria, Medellín, Colombia

³ Instituto Colombiano de Medicina Tropical, Universidad CES, Sabaneta, Colombia

⁴ Facultad de Medicina, Universidad CES, Medellín, Colombia

Introducción. La composición genética del huésped determina, entre otros aspectos, el perfil clínico del dengue, lo cual se debería al efecto de variantes en los genes que codifican citocinas proinflamatorias.

Objetivo. Evaluar la asociación entre las variantes de tres polimorfismos en los genes candidatos *TNFA*, *IL6* e *IFNG* con la gravedad del dengue en una población colombiana.

Materiales y métodos. Se evaluaron los polimorfismos rs1800750, rs2069843 y rs2069705 de los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente, en 226 pacientes con dengue. Los genotipos se tipificaron usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Para determinar el riesgo de diferentes fenotipos del dengue, se compararon las frecuencias alélicas con la prueba de ji al cuadrado, y los genotipos y los haplotipos, con regresión logística. Por último, los análisis se ajustaron utilizando datos de autoidentificación o del componente genético ancestral.

Resultados. El alelo A del rs2069843, ajustado por autoidentificación, se asoció con casos de dengue hemorrágico en afrocolombianos. En la muestra completa, dicho polimorfismo, ajustado por componente genético ancestral, fue reproducible. Además, hubo asociaciones significativas entre las combinaciones alélicas GGT y GAC de los rs1800750, rs2069843 y rs2069705 en pacientes con dengue hemorrágico, con ajuste por componente genético ancestral y sin él. Además, la combinación alélica AGC produjo 58,03 pg/ml más de interleucina 6 que la GGC, independientemente de los componentes genéticos europeo, amerindio y africano.

Conclusión. Las variantes de los polimorfismos GGT y GAC de los rs1800750, rs2069843 y rs2069705 en los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente, se correlacionaron con la gravedad del dengue en esta muestra de población colombiana.

Palabras clave: dengue/genética; citocina; genotipo; reacción en cadena de la polimerasa; polimorfismo (genética); Colombia

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305>

Variants in the *TNFA*, *IL6* and *IFNG* genes associated with dengue severity in a sample of Colombian population

Introduction: The genetic makeup of the host contributes to the clinical profile of dengue. This could be due to the effect of variants in the genes encoding pro-inflammatory cytokines.

Objective: To evaluate the association between the variants of three polymorphisms in *TNFA*, *IL6* and *IFNG* candidate genes with dengue severity in a sample of Colombian population.

Materials and methods: We evaluated the rs1800750, rs2069843, and rs2069705 polymorphisms in *TNFA*, *IL6* and *IFNG* candidate genes, respectively, in 226 patients with dengue infection. The genotypes were typed using both polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). To determine the risk of different dengue phenotypes, we compared allele frequencies with chi-square and genotypes and haplotypes using logistic regression. Finally, these analyzes were adjusted with data from self-identification or the ancestral genetic component.

Contribución de los autores:

Berta Nelly Restrepo: concepción de la idea de investigación, contribución con materiales, reactivos y herramientas analíticas, escritura del manuscrito

Winston Rojas: contribución con materiales, reactivos y herramientas analíticas

Efrén Avendaño Tamayo: escritura del manuscrito

Gabriel Bedoya: contribución con materiales, reactivos y herramientas analíticas, supervisión del análisis de datos

Todos los autores concibieron y diseñaron los experimentos.

Results: The A allele in the rs2069843 polymorphism, adjusted by self-identification, was associated with dengue hemorrhagic fever cases in Afro-Colombians. In the entire sample, this polymorphism, adjusted by the ancestral genetic component, was reproducible. In addition, there were significant associations between GGT and GAC allelic combinations of rs1800750, rs2069843, and rs2069705 in dengue hemorrhagic fever patients, with and without adjustment by ancestral genetic component. Additionally, the AGC allelic combination produced 58.03 pg/ml of interleukin-6 more than the GGC combination, regardless of European, Amerindian and African genetic components.

Conclusions: The variants of GGT and GAC polymorphisms of rs1800750, rs2069843, and rs2069705 in the *TNFA*, *IL6* and *IFNG* genes, respectively, were correlated with the susceptibility to dengue severity in a sample of Colombian population.

Key words: Dengue/genetics; cytokines; genotype; polymerase chain reaction; polymorphism, genetic; Colombia.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305>

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por el virus del dengue (DENV), el cual es transmitido por la picadura de mosquitos del género *Aedes* (1). Esta virosis es endémica en más de 100 países de zonas tropicales y subtropicales del mundo (2). Según datos del Instituto Nacional de Salud, en Colombia, el dengue es endemo-epidémico, con un promedio anual de más de 60.000 casos confirmados (3).

Su espectro de manifestaciones clínicas varía desde las formas indiferenciadas o leves hasta las graves. Cualquiera de los serotipos (DENV-1 a 4) puede causar la enfermedad grave (4), caracterizada por extravasación del plasma, hemorragias y trombocitopenia, siendo la extravasación del plasma el rasgo más importante porque determina la gravedad de la infección (5).

Los mecanismos involucrados en el desarrollo de las formas graves no son del todo claros. Se ha postulado que los factores virales (6,7), el hecho de que la infección haya estado precedida de otra causada por un serotipo diferente (8), y factores asociados con el huésped, entre ellos los genéticos, pueden influir en la proclividad a presentar el dengue grave (8-10).

Las citocinas tienen un papel importante en la inmunopatogenia del dengue y algunas se han asociado con la gravedad de la enfermedad (11-13), tal como se ha reportado para el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la interleucina 6 (IL-6) y el interferón (IFN- γ) (14,15). Sus niveles de producción pueden estar influenciados por el componente genético ancestral, como se ha demostrado previamente (10).

Correspondencia:

Efrén Avendaño-Tamayo, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52-59, torre 2, laboratorio 430, Medellín, Colombia

Teléfono: (574) 219 6467; fax: (574) 219 6469

efren.avendano@udea.edu.co

Recibido: 29/03/16; aceptado: 14/12/16

La intensidad de la reacción inmunitaria depende en gran medida del control de la expresión génica y, desde esa perspectiva, puede entenderse la importancia de las diferencias individuales en el riesgo genético frente a la gravedad del dengue.

La expresión de los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG* fue elevada en casos de dengue hemorrágico, pero este grupo de transcritos no siempre se expresaron en el mismo grupo étnico (16,17).

Los polimorfismos genéticos con efecto sobre la regulación de la transcripción se han relacionado con la producción de citocinas y la gravedad del perfil clínico (18). Hay diferencias sustanciales entre distintas poblaciones en las frecuencias alélicas de algunos de ellos debido al efecto de la mezcla genética (19), por lo cual debe considerársela como una factor de confusión.

El gen *IL6*, localizado en el cromosoma 7p21, codifica la citocina IL-6, mediadora de la fiebre y reguladora negativa de la coagulación y la fibrinólisis (20). Las variantes de este gen han sido candidatas exitosas en la búsqueda de variantes puntuales con efecto sobre el desarrollo de los signos y los síntomas del dengue (21). Por ejemplo, se ha reportado que el polimorfismo -714 G/C en la región promotora afecta su transcripción, incrementándola en los casos de dengue que progresaron en gravedad (20,22), en tanto que el genotipo -714 G/G demostró ser un factor protector (23).

El gen *TNFA*, localizado en el cromosoma 6, codifica para la citocina TNF- α que regula la diferenciación, la proliferación, la apoptosis de células infectadas, el metabolismo de los lípidos y la coagulación, y participa en la reacción inmunitaria innata y en la humoral (20). Las frecuencias del alelo -308 A y del haplotipo -238 *TNFA/LTA* fueron mayores en los casos de dengue hemorrágico (24) en población venezolana y tailandesa, respectivamente (18,20). Localizado en el cromosoma 12, el gen *IFNG* codifica

la citocina IFN- γ , fundamental en la defensa contra el virus (25). La variante -1615 C/T en la región promotora, se asoció con niveles séricos altos de IFN- γ , y la variante T/T del polimorfismo llamado rs2430561 (*reference sequence*, rs), fue más frecuente en los casos de dengue hemorrágico (26).

En el presente estudio se propuso determinar el grado de asociación de las variantes genéticas evaluadas con la infección o la progresión del dengue, variantes que, después de comprobarse el significado biológico de las asociaciones, podrían usarse como marcadores moleculares de sensibilidad o pronóstico. Dado que en estudios anteriores no se ha considerado el componente ancestral, el objetivo fue evaluar la relación entre las variantes de tres polimorfismos en tres genes de citocinas con la gravedad del dengue, en una muestra de población colombiana.

Materiales y métodos

Tipo de estudio y población de estudio

Se hizo un estudio prospectivo de corte transversal. La población de estudio estuvo constituida por 226 pacientes con diagnóstico de dengue. Los casos se capturaron a partir de los registros de la vigilancia activa de pacientes con síndrome febril de siete días o menos de evolución que consultaron en varias instituciones de salud de los departamentos de Antioquia y Chocó en el período de agosto de 2008 a noviembre de 2009. Estos departamentos se eligieron por su reconocido contraste poblacional en cuanto a su composición genética ancestral (27). La gota gruesa positiva para malaria fue criterio de exclusión de caso.

La clasificación de las formas clínicas de dengue se hizo según los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1997, la cual clasificaba los casos en fiebre por dengue y dengue hemorrágico (1,28).

Diagnóstico de infección

La confirmación en el laboratorio de la infección por DENV se hizo mediante la detección de anticuerpos IgM específicos contra el virus en todas las muestras de suero obtenidas en la fase aguda y en 100 muestras obtenidas en la fase de convalecencia de los pacientes que fueron a la segunda toma de la muestra.

Las muestras se procesaron con una prueba comercial (ELISA de captura - Dengue IgM Panbio™, Sinnamon Park, Australia), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Esta prueba

tiene una sensibilidad en la fase aguda de 82,2 % (IC_{95%} 78-87), y de 93,7 % (IC_{95%} 90-96) en la fase convaleciente, y una especificidad de 87,8 % (IC_{95%} 82-93) (29).

En 45 de los pacientes se detectó el genoma viral en la muestra de la fase aguda mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR), usando el protocolo establecido por Lanciotti (30) y adaptado por Harris (31) (cuadro suplementario 1 disponible en: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305>). El número de pruebas dependió de la disponibilidad de los reactivos.

Además, se detectaron anticuerpos IgG con un estuche comercial (Dengue IgG Capture ELISA™, Panbio, Sinnamon Park, Australia) en la muestra de la fase aguda, con el fin de determinar la infección secundaria y la primaria según la presencia o no de estos anticuerpos. Esta prueba clasifica correctamente 67 % de los casos con infección secundaria por dengue (29).

Los sueros obtenidos de los pacientes fueron centrifugados y conservados a -20 °C para, finalmente, almacenarlos a -70 °C hasta su procesamiento en los grupos de investigación de genética molecular de la Universidad de Antioquia y del Instituto Colombiano de Medicina Tropical. Los niveles de las citocinas TNF- α , IL-6 e IFN- γ se midieron en la muestra de suero de la fase aguda de la enfermedad, utilizando estuches comerciales y siguiendo las instrucciones del proveedor (Quantikine HS-High Sensitivity™, R & D Systems, Minneapolis, MN).

Extracción de ADN y tipificación de variantes en genes candidatos

El ADN se extrajo de una muestra de sangre de 5 ml mediante el método fenol-cloroformo (32). Las variantes rs1800750, rs2069843 y rs2069705 se tipificaron mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa combinados con polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Los genes candidatos se seleccionaron con base en los estudios de fisiopatología del dengue citados en la introducción (11-18,20-22,24,26). Los cebadores utilizados están detallados en el cuadro suplementario 1. Los genotipos se determinaron por la ausencia o presencia de los sitios de corte usando las endonucleasas *TaqI*, *Eco88I* y *HpaI* en los rs1800750 G/A, rs2069843 G/A y rs2069705 C/T, respectivamente. Los alelos de corte "A", "G"

y "T" generaron, en su orden, los fragmentos de 214 pb, 579 pb, 104 pb, 196 pb, 220 pb y 54 pb. El tiempo de incubación con enzimas se determinó de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Por último, los fragmentos fueron resueltos en electroforesis con geles de agarosa al 2,5 %.

Marcadores informativos de componente genético ancestral

Con base en los mayores valores de delta entre las frecuencias alélicas de los marcadores del componente genético ancestral (*Ancestry-Informative Markers*, AIM) en poblaciones ancestrales continentales presentadas en el cuadro suplementario 2 disponible en: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305>, se seleccionaron los 19 AIM detallados en el cuadro suplementario 3 disponible en: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305>, los cuales se usan para calcular los porcentajes individuales de componente ancestral de forma similar a la empleada por Chacón o Shriver y Parra (33-35). En general, estos se amplificaron mediante PCR, y tanto los polimorfismos de inserción y deleción como los que requirieron el uso de RFLP se resolvieron en electroforesis capilar (ABI-310) y en geles de agarosa.

Análisis

Las variantes génicas de los pacientes con dengue se compararon con las de aquellos con dengue hemorrágico; se comparó, asimismo, entre infección primaria y secundaria, presencia y ausencia de trombocitopenia, y según los niveles séricos del TNF- α , la IL-6 y el IFN- γ , en la muestra de la fase aguda.

La base de datos se elaboró en Microsoft Excel. La comparación de las variables dicotómicas entre grupos se hizo mediante la prueba de ji al cuadrado, y la de las variables continuas, usando la prueba U de Mann-Whitney, ambas del paquete SPSS™ (*Statistical Package for the Social Sciences*), versión 22.

La prueba de normalidad utilizada fue la de Kolmogorov-Smirnov. Con la prueba de ji al cuadrado, se evaluaron las diferencias entre las frecuencias alélicas calculadas a partir de los genotipos con el programa Arlekin 3.5 y, las desviaciones genotípicas del equilibrio de Hardy-Weinberg, con Genpop V4. Con el programa Admixmap 3.8, se determinó la composición genética ancestral promedio e individual a partir de los AIM mediante un algoritmo bayesiano (36).

Para evaluar las asociaciones de genotipos y combinaciones alélicas inferidas a partir de los genotipos, se calcularon la razón de probabilidades (*odds ratio*, OR), el intervalo de confianza (IC) del 95 % y el nivel de significación (valor de p menor de 0,05) mediante regresiones logísticas utilizando máxima verosimilitud en el lenguaje de programación R en interface con el programa SNPstat 2.14.

Además, se ensayaron los modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo y sobredominante). Para validar y contrastar las asociaciones, la prueba de ji al cuadrado se hizo sin estratificación por autoidentificación y con ella, y las regresiones logísticas se hicieron primero sin ajuste y, posteriormente, con ajuste considerando un componente genético ancestral (europeo, amerindio o africano) a la vez.

Consideraciones éticas

El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Colombiano de Medicina Tropical - Universidad CES, y el consentimiento informado fue aceptado y firmado por todos los participantes.

Resultados

Descripción de la población

La descripción de los pacientes de estudio se presenta en el cuadro 1. Se incluyeron 226 casos confirmados de dengue, sin diferencias en la distribución por sexo. Por autoidentificación, hubo más afrocolombianos que mestizos.

El diagnóstico de dengue se confirmó en 97,8 % (221/226) de los casos mediante la presencia

Cuadro 1. Descripción de los pacientes captados para este estudio

Parámetro	Detalle	n	%
ELISA IgM ^a	Positivo	194	85,8
Seroconversión de IgM	Positivo	27	11,9
RT-PCR ^a	Positivo	5	2,2
Formas clínicas	FD ^b	204	90,3
	DH ^c	22	9,7
Tipo de infección	Primaria	134	60,4
	Secundaria	88	39,6
Autoidentificación	Mestizo	104	46,0
	Afrocolombiano	122	54,0
Sexo	Hombres	110	48,7
	Mujeres	116	51,3
Edad (años)	Promedio \pm DE	24,5 \pm 18,8	

^a Prueba realizada en muestras de fase aguda

^b FD fiebre por dengue

^c DH: dengue hemorrágico

de anticuerpos IgM, y 27 de ellos tuvieron seroconversión de IgM entre la muestra de la fase aguda y la de la fase de convalecencia, y en 2,2 % (5/226) mediante RT-PCR. Se identificaron los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-3. Según el diagnóstico de la forma clínica, 22 tuvieron dengue hemorrágico y, de ellos, 17 eran mestizos y solo cinco eran afrocolombianos (p=0,003). En cuanto a la procedencia geográfica, 21 casos fueron de Antioquia y solo uno del Chocó.

Aunque la frecuencia de infección secundaria fue mayor en los casos de dengue hemorrágico que en los de fiebre por dengue (57 y 38 %, respectivamente), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Los signos clínicos, así como los niveles de citocinas y trombocitopenia, se resumen en el cuadro 2. Se presentó trombocitopenia en 47,30 % de los afrocolombianos y en 66,70 % de los mestizos, lo que corresponde a una diferencia de 19,4 %. Con relación a los niveles séricos de citocinas, se observó un promedio mayor de IL-6 e IFN-γ en pacientes afrocolombianos, comparado con el de los mestizos, pero, en promedio, los niveles de TNFα fueron similares entre los dos grupos étnicos.

Con el fin de observar mejor las diferencias, se presentaron los promedios con sus respectivas desviaciones estándar; sin embargo, al aplicar el cálculo estadístico para evaluar las diferencias de citocinas entre grupos étnicos, se usaron las medianas en una prueba U de Mann-Whitney.

Composición genética ancestral

Los dos grupos étnicos presentaron algún grado de mezcla genética ancestral. En los afrocolombianos, el componente europeo fue, en promedio, de

0,150, con una desviación estándar de ± 0,125, el amerindio fue de 0,098 ± 0,121 y el africano fue de 0,752 ± 0,184. Por el contrario, los mestizos tuvieron 0,652 ± 0,100 de componente europeo, 0,193 ± 0,075 del amerindio y 0,155 ± 0,081 del africano (cuadro suplementario 4 disponible en: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305>).

Tipificación en los genes candidatos

En los resultados de este estudio, ningún polimorfismo en los genes candidatos se excluyó del análisis porque no hubo alelos de menor frecuencia (*Minor Allele Frequency*, MAF) por debajo de 1 %. Además, una vez hechos los ajustes considerando la autoidentificación, ninguno de los *loci* estuvo por fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg. Asimismo, la tasa de datos perdidos fue mínima. El rs1800750 en la región del *TNFA* se vio por fuera del equilibrio, lo cual ocurrió solo cuando la muestra de colombianos (afrocolombianos y mestizos) fue tratada como una sola población, lo cual es congruente con un efecto de Wahlund (37). Las frecuencias alélicas de los rs1800750, rs2069843 y rs2069705 en la muestra completa fueron 0,0333, 0,1134 y 0,4667, respectivamente (cuadro suplementario 5 disponible en: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3305>).

Asociación de alelos con dengue hemorrágico

Los alelos de menor frecuencia para cada polimorfismo rs1800750, rs2069843 y rs2069705, de los genes candidatos *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente, en los casos de dengue hemorrágico y fiebre por dengue, se muestran en el cuadro 3. Allí se presentan las frecuencias alélicas calculadas en la muestra completa y en los grupos estratificados con los datos de autoidentificación. Hubo una sola asociación significativa entre dichas frecuencias alélicas.

Cuadro 2. Descripción de los pacientes captados para este estudio

Parámetro	Afrocolombiano			Valor p	Mestizo			p	Valor de p para afrocolombiano/mestizo
	FD ^a n=117	DH ^b n=5	Total n=122		FD ^a n=87	DH ^b n=17	Total n=104		
IL-6	21,75±59,65	6,62±8,58	21,08±58,42	0,480	10,49±49,96	19,05±62,67	11,80±51,9	0,156	FD ^a =0,000 DH ^b =0,168 Total=0,000
TNFα	3,90±6,20	6,78±8,46	4,02±6,29	0,364	4,64±6,94	2,81±3,85	4,34±6,56	0,454	FD ^a =0,688 DH ^b =0,337 Total=0,946
IFNγ	38,25±130,31	0,44±0,60	36,59±127,63	0,993	19,20±93,99	0,00±0,00	16,06±86,18	0,090	FD ^a =0,049 DH ^b =0,010 Total=0,008
Trombocitopenia		47,30 %				66,70 %		0,012	

^a FD: fiebre por dengue; ^b DH: dengue hemorrágico. Se muestran los promedios.
^c ± desviación estándar. Valor de p en la prueba U de Mann Whitney

En el grupo de pacientes afrocolombianos, el alelo "A" en la región del rs2069843 del gen *IL6*, se observó con gran frecuencia en los casos de dengue hemorrágico en comparación con los de fiebre por dengue (40 y 11 %, respectivamente; OR=5,394; IC_{95%} 2,565-11,34; p<0,0001). Este alelo (A) tuvo un comportamiento similar en la muestra completa y en el grupo de pacientes mestizos, sin embargo, las diferencias no fueron significativas. Tampoco fueron significativas las demás diferencias en las frecuencias alélicas de rs1800750 y rs2069705.

Asociación de genotipos en pacientes con dengue hemorrágico

Cuatro señales importantes se identificaron en las frecuencias genotípicas y se presentan en el cuadro 4. La frecuencia del genotipo "G/A" en la región del rs2069843 fue significativamente más alta en pacientes con dengue hemorrágico que en aquellos con dengue por fiebre, ajustada por componente genético ancestral africano (34,8 % Vs. 15,8 %; OR=3,99; IC_{95%} 1,45-11,00; p=0,026) y por el europeo (OR=3,96; IC_{95%} 1,43-10,97; p=0,028). Además, el mismo genotipo ajustado por el componente

Cuadro 3. Asociación de alelos con dengue hemorrágico en la muestra completa y ajustada por autoidentificación

Gen	SNP	Alelos	Muestra completa			Autoidentificación y formas clínicas					
			Formas clínicas			Afrocolombianos			Mestizos		
			FD ^b	DH ^c	OR ^d	FD ^b	DH ^c	OR ^d	FD ^b	DH ^c	OR ^d
			(IC _{95%}) ^e			(IC _{95%}) ^e			(IC _{95%}) ^e		
			p ^f			p ^f			p ^f		
<i>TNFA</i>	rs1800750	A	0,04	0,04	1 (0,2430-4,116)	0	0,03	0,1386 (0,007061-2,720)	0,04	0,06	1,532 (0,4187-5,604)
<i>IL6</i>	rs2069843	A	0,09	0,17	1 (0,8753-4,900)	0,11	0,40	5,394 (2,565-11,34)	0,06	0,11	1,936 (0,6869-5,458)
<i>IFNG</i>	rs2069705	T	0,47	0,57	1,495 (0,8558-2,611)	0,50	0,47	1,128 (0,6474-1,964)	0,48	0,58	1,496 (0,8560-2,615)

^a SNP: polimorfismo de nucleótido simple; ^b FD: fiebre por dengue; ^c DH: dengue hemorrágico; ^d OR: Odds Ratio; ^e IC_{95%}: intervalo de confianza de 95 %; ^f Valor de p en la prueba de ji al cuadrado; ^g Asociación significativa

Cuadro 4. Asociación de genotipos con dengue hemorrágico en la muestra completa ajustada por componente ancestral

Gen	Genotipo	Formas clínicas		Sin ajuste	Ajustado por componente africano	Ajustado por componente europeo	Ajustado por componente amerindio
		FD ^b n (%)	DH ^c n (%)	OR ^d (IC _{95%}) ^e p ^f			
<i>TNFA</i>	G/G	186 (92,5)	21 (91,3)	1	1	1	1
	A/G	15 (7,5)	2 (8,7)	1,18 (0,25-5,52)	1,04 (0,21-5,01)	1,04 (0,21-5,01)	1,24 (0,26-5,85)
	A/A	0(0)	0 (0)	0,84 N/A ^g	0,96 N/A ^g	0,96 N/A ^g	0,79 N/A ^g
<i>IL6</i>	G/G	168 (83,2)	15 (65,2)	1	1	1	1
	G /A	32 (15,8)	8 (34,8)	2,80 (1,10-7,15)	3,99 (1,45-11,00)	3,96 (1,43-10,97)	2,85 (1,10-7,33)
	A/A	2 (1)	0 (0)	0,10 N/A ^g	0,03 ^h N/A ^g	0,03 ^h N/A ^g	0,10 N/A ^g
<i>IFNG</i>	C/C	60 (29,9)	4 (17,4)	1	1	1	1
	T/C	93 (46,3)	12 (52,2)	1,94 (0,60-6,28)	2,13 (0,64-7,05)	1,95 (0,60-6,40)	2,21 (0,66-7,41)
	T/T	48 (23,9)	7 (30,4)	0,41 2,19 (0,60-7,91)	0,35 2,31 (0,63-8,54)	0,44 2,09 (0,57-7,64)	0,29 2,55 (0,68-9,56)

^a SNP: polimorfismo de nucleótido simple; ^b FD: fiebre por dengue; ^c DH: dengue hemorrágico; ^d OR: Odds Ratio; IC_{95%}: intervalo de confianza al 95%; ^f Valor de p de la regresión logística; ^g N/A: no fue calculado; ^h Asociación significativa; ⁱ IC no pasa por uno

amerindio (OR=2,85; IC_{95%} 1,10-7,33; p=0,10) y sin ajuste por el componente ancestral (OR=2,80; IC_{95%} 1,10-7,15; p=0,10) mostró, en ambos, intervalos de confianza de 95 % significativos, aunque el valor de p no lo fue. Las demás frecuencias genotípicas en otros polimorfismos (rs1800750 y rs2069705) no presentaron diferencias significativas en su distribución, al confrontar las de los casos de fiebre por dengue con los de fiebre por dengue.

Asociación de combinaciones alélicas en dengue hemorrágico

Hubo nueve asociaciones significativas de combinaciones alélicas en el dengue hemorrágico (cuadro 5), cuatro de ellas en la combinación alélica No. 2 GGT, la cual tuvo mayor frecuencia en los casos de dengue hemorrágico que en los de fiebre por dengue (53 y 39 %, respectivamente), sin ajuste por el componente ancestral (OR=2,80; IC_{95%} 1,26-6,24; p=0,012), e igualmente significativo con cualquier ajuste (africano, europeo o amerindio).

Un comportamiento similar se observó en la combinación alélica No. 4, GAC, vista con mayor frecuencia en los casos de dengue hemorrágico

que en los de fiebre por dengue (4 Vs. 3 %), el cual fue significativo sin ajuste (OR=11,09; IC_{95%} 2,58-47,60; p=0,001) y con cualquier ajuste.

La frecuencia de la combinación alélica No. 5, AGC, fue elevada en los casos de dengue hemorrágico comparados con los de fiebre por dengue (4 % y 1 %, respectivamente), y fue significativa solo cuando se ajustó por el componente amerindio (OR=8,11; IC_{95%} 1,09-60,49; p=0,042).

Asociación de las variantes génicas en los endofenotipos relacionados con la gravedad del dengue

En el presente estudio, no hubo asociaciones significativas de los genotipos o alelos estudiados con los niveles séricos de las tres citocinas exploradas en la muestra completa. Las combinaciones alélicas evaluadas tampoco se asociaron con las diferencias en los niveles de IFN-γ, ni con los niveles del TNF-α (no se muestran los datos).

Sin embargo, se encontraron cuatro asociaciones de combinaciones alélicas con los niveles de IL-6 (cuadro 6). Concretamente, la combinación alélica

Cuadro 5. Asociación de combinaciones alélicas con dengue hemorrágico en la muestra completa ajustada por componente ancestral

No. ^a	Ca ^b	Formas clínicas		Sin ajuste	Ajustado por componente africano	Ajustado por componente europeo	Ajustado por componente amerindio
		FD ^c (%)	DH ^d (%)	OR ^e (IC _{95%}) ^f valor p ^g	OR ^e (IC _{95%}) ^f valor p ^g	OR ^e (IC _{95%}) ^f valor p ^g	OR ^e (IC _{95%}) ^f valor p ^g
1	G G C	47	24	1	1	1	1
2	G G T	39	53	2,80(1,26-6,24)0,012 ^h	2,67(1,20-5,94)0,017 ^h	2,55(1,15-5,66)0,022 ^h	3,14(1,37-7,19)0,007 ^h
3	G A T	5	3	1,02(0,13-8,33)0,98	1,21(0,13-11,52)0,87	1,08(0,12-10,04)0,95	1,14(0,14-9,05)0,90
4	G A C	3	4	11,09(2,58-47,60)0,001 ^h	12,03(2,74-52,82)0,001 ^h	10,97(2,59-46,39)0,001 ^h	12,22(2,78-53,66)0,001 ^h
5	A G C	1	4	7,05(0,99-50,29)0,053	4,72(0,68-32,62)0,12	4,83(0,69-33,56)0,11	8,11(1,09-60,49)0,042 ^h

^aNo.: número asignado a la combinación alélica; ^bCa: combinación alélica conformada por los SNP rs1800750 - rs2069843 - rs2069705 en los genes TNFA, IL6 e IFNG, respectivamente; ^cFD: fiebre por dengue; ^dDH: dengue hemorrágico; ^eOR: Odds Ratio; ^fIC_{95%}: intervalo de confianza de 95 %; ^gValor de p de la regresión logística; ^hAsociación significativa

Cuadro 6. Asociación de combinaciones alélicas con los niveles de interleucina-6 en la muestra completa ajustada por componente ancestral

No. ^a	Ca ^b	Proporción	Sin ajuste	Ajustado por componente africano	Ajustado por componente europeo	Ajustado por componente amerindio
			Media	Media	Media	Media
			Diferencia en pg/ml (IC _{95%}) ^c valor de p ^d	Diferencia en pg/ml (IC _{95%}) ^c valor de p ^d	Diferencia en pg/ml (IC _{95%}) ^c valor de p ^d	Diferencia en pg/ml (IC _{95%}) ^c valor de p ^d
1	G G C	0,462	0,001	0,001	0,001	0,001
2	G G T	0,405	6,6(-4,49-17,68)0,24	7,12 (-3,92-18,15)0,21	6,69 (-4,48-17,86)0,24	6,03(-4,93-16,99)0,28
3	G A T	0,052	5,93 (-17,94-29,8)0,63	4,76 (-18,95-28,47)0,69	5,79 (-18,19-29,78)0,64	5,94(-17,6-29,48)0,62
4	G A C	0,045	-3,3 (-30,84-24,24)0,81	-3,17 (-30,56-24,23)0,82	-3,32(-30,93-24,28)0,81	-2,49(-29,7-24,72)0,86
5	A G C	0,017	58,03 (7,47-109)0,025 ^e	63,78 (12,58-115)0,015 ^e	58,53 (7,46-110)0,026 ^e	61,01 (10,57-111)0,019 ^e

^aNo.: número asignado a cada combinación alélica; ^bCa: combinación alélica conformada por los SNP rs1800750 - rs2069843 - rs2069705 en los genes TNFA, IL6 e IFNG, respectivamente; ^cIC_{95%}: intervalo de confianza al 95 %; ^dValor de p de la regresión logística; ^eAsociación significativa

nombrada como No. 5 AGC, comparada con la No. 1 GGC, presentó diferencias significativas sin ajuste por componente genético ancestral en pg/ml (58,03 pg/ml Vs. 0,0001 pg/ml; $p=0,025$); asimismo, hubo diferencias significativas ajustando con cualquier componente genético ancestral (africano, europeo o amerindio).

Solo el genotipo "C/T" de la región del SNP 2069705 del *IFNG* se asoció con una mayor presencia de trombocitopenia comparada con su ausencia (47 % Vs. 20 %), cuando se ajustó por el componente africano ($p=0,041$), y también fue significativo cuando se ajustó por el amerindio ($p=0,04$), pero no así al ajustarlo por el europeo (no se muestran los datos).

Por último, no hubo relación entre las frecuencias de alelos, genotipos o combinaciones alélicas confrontadas con la infección secundaria (no se muestran los datos).

Discusión

Este estudio de epidemiología genética se realizó para evaluar la asociación de tres variantes en tres genes codificantes de citocinas con la gravedad del dengue. La hipótesis fue que los rs1800750, rs2069843 y rs2069705 de los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente, estaban implicados en la presentación de las formas graves. Para probarla, se compararon los fenotipos del dengue relacionados con diferencias en las formas clínicas, como el dengue hemorrágico y la fiebre por dengue, y los endofenotipos, como los niveles séricos producidos por los genes estudiados, así como la presencia de trombocitopenia e infección secundaria, todo en una muestra de casos de una población colombiana.

Durante el período de estudio, se identificaron los serotipos DENV-1 a DENV-3, en concordancia con los serotipos que circularon entre los años 2008 y 2009 en el departamento de Antioquia (comunicación personal, Laboratorio Departamental de Salud Pública). El 2,2 % de los casos de dengue se confirmaron mediante RT-PCR con base en el total de la población estudiada (5/226), sin embargo, por esta técnica se diagnosticó 11,1 % (5/45). Otros autores han reportado la detección de ARN mediante RT-PCR en 48,4 % de los casos (38), diferencias que pueden explicarse por el tiempo de la toma de la muestra y la fecha de inicio de síntomas o con la prueba que se compara. En el presente estudio, la mayoría de los pacientes presentaban anticuerpos IgM en la fase aguda, es

decir, con más de cinco días de evolución de los síntomas, lo cual se relaciona con la disminución de la viremia y dificulta la detección del ARN viral.

Como se sabe que la composición genética individual puede influir en el riesgo de presentar formas graves del dengue (35), se puede considerar que una ventaja de este estudio fue haber controlado el análisis de asociación de polimorfismos génicos con información previa de los ancestros continentales, tal y como se ha recomendado para este tipo de estudios (39).

Como era de esperarse, los grupos poblacionales estudiados difirieron en las proporciones genéticas ancestrales y, así como Galanter (28) determinó las proporciones de mezcla ancestral en una muestra colombiana, también se encontró que los mestizos tenían mayor componente genético europeo mezclado con los componentes amerindio y africano (cuadro suplementario 4). Esta concordancia es un buen indicador de la confiabilidad de los datos analizados.

El análisis de variantes puso en evidencia el efecto génico puntual sobre el dengue hemorrágico. En primer lugar, el alelo "A" del rs2069843 del gen *IL6* se relacionó con el dengue hemorrágico en afrocolombianos (cuadro 3), resultado curioso, pues se esperaba hallar variantes de resistencia en este grupo poblacional. No es la primera vez que se encuentran polimorfismos causales del incremento en la gravedad clínica en reacción a infecciones en poblaciones de ascendencia africana (40). La misma tendencia (incremento de A), también se observó en los pacientes mestizos, con la diferencia de no haber sido significativa, quizá porque se requeriría un mayor tamaño del grupo de dengue hemorrágico en este grupo poblacional (mestizos) para que el marcador genético alcance el mismo poder de discriminación, y también valida la autoidentificación africana como el estado de la variable con mayor influencia sobre las diferencias en la gravedad del dengue.

En segundo lugar, en la muestra completa los ajustes con la composición genética ancestral individual revelaron la relación entre el genotipo "G/A" del mismo rs2069843 con dengue hemorrágica, independientemente de los componentes ancestrales (cuadro 4). Este resultado sugiere el genotipo "G/A" como un biomarcador de la predisposición al dengue hemorrágico en Colombia, que no depende de los componentes genéticos ancestrales individuales ni la autoidentificación para determinar los grupos de riesgo.

El rs2069843 está en una región génica con alto grado de desequilibrio de ligamiento (41). En estudios recientes se ha demostrado el alto grado de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos sinténicos rs2069843 y rs2069845, cuyas variantes se heredan como haplotipos en el mismo gen (*IL6*) en poblaciones con un importante componente genético africano como la brasileña (42). Esta información sugiere que las variantes de importancia médica en este gen podrían ser heredadas en bloque, no solo en poblaciones con mayor ascendencia afroamericana, sino también en otras etnias de América en proceso de mezcla genética, como en el caso de Colombia (43).

En los artículos consultados, no se encontró evidencia de la relación directa entre el rs2069843 ubicado en el último intrón, su ligamiento con otros rs y sus efectos sobre la transcripción; por eso se propone que este polimorfismo, así como el rs2069845, podría estar relacionado con el dengue hemorrágico en poblaciones en proceso de mezcla. Además, bajo el supuesto de estar ligados a otros rs ubicados en la región promotora, también lograrían predecir los niveles de transcripción, tal como lo sugieren los resultados de Fernández-Real (44) e, incluso, podría probarse su papel como biomarcador inflamatorio, pues de forma similar a lo encontrado en nuestro estudio, al controlar las diferencias por componente ancestral se descubrieron genotipos de riesgo frente al dengue hemorrágico (45).

Aquí, la combinación alélica "AGC" compuesta por los alelos de los rs1800750, rs2069843 y rs2069705 de los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG*, respectivamente, produjo 58,03 pg/ml de *IL-6* más que la combinación alélica "GGC", independientemente del componente ancestral (cuadro 6), lo cual respalda el efecto de las variantes directamente responsables de endofenotipos del dengue y su reacción diferencial. La mayor reacción de *IL-6* fue ajustada por el componente africano, lo cual es congruente con datos publicados previamente que registraron el más alto nivel de *IL-6* en afrocolombianos (46).

Estas asociaciones reiteradas en el cuadro 6 muestran un biomarcador deletéreo en los casos confirmados de dengue, independientemente del diagnóstico de fiebre por dengue o dengue hemorrágico y, también, del componente genético ancestral. Sin embargo, la mayor reacción observada al ajustar por el componente africano sugiere la existencia de otras variantes con origen en ese componente que no se consideraron en este estudio y que también tienen efecto.

El hecho de que el incremento en la frecuencia de la combinación alélica "AGC" en casos de dengue hemorrágico ajustados por el componente africano no fue significativo (cuadro 5), no impide ver su tendencia; además, el valor de la probabilidad sin ajuste por ancestro se mantuvo en el límite de la significación. Por lo tanto, no se descarta el efecto de dicha variante en la predicción de dengue hemorrágico, más aún considerando las relaciones de las variantes presentadas en los cuadros 5 y 6.

Como contrapartida, el incremento sustancial de la propensión al dengue hemorrágico encontrada en la combinación alélica "AGC" ajustada por el componente amerindio, conjuntamente con su tendencia cuando no se ajustó (cuadro 5), apuntan a un efecto sobre la forma clínica del dengue, no solo de las variantes aquí estudiadas, sino que también sugiere la existencia de otras variantes de riesgo con origen amerindio que se deben continuar buscando, como lo han sugerido Silva, *et al.* (47).

La importancia del estudio de estas combinaciones alélicas reside en que los polimorfismos no actúan independientemente de otros (20), y controlan en su conjunto la función génica al alterar los sitios de inicio de la transcripción (17) y, por ello, deben probarse a la luz de la expresión génica en otros ensayos funcionales en el futuro.

Desde el punto de vista de la fisiopatología, el incremento de *IL-6* en el dengue activa el endotelio, predisponiendo a la disfunción plaquetaria, e induce un activador de plasminógeno que lleva a la extravasación de plasma asociada al dengue hemorrágico (48), incrementa la expresión génica del fibrinógeno y el plasminógeno en hepatocitos y, como sucede en otras virosis como la fiebre amarilla, induce manifestaciones hemorrágicas (49). No es la primera vez que el rs2069843 se ha asociado a una enfermedad que podría implicar sangrado en población americana (50).

Por otra parte, los niveles del TNF- α pueden ser bajos cuando los de sus propios receptores son altos, lo que podría explicar por qué no se encontró asociación entre variantes del rs1800750 en la región promotora del *TNFA* y su producto génico, a pesar de que recientemente se reportó la determinación del rs1800750 sobre sus niveles séricos y la transcripción como reacción a un agente infeccioso (51).

Aunque el rs2069705 en el gen *IFNG* se ha asociado previamente con las diferencias en el IFN- γ como reacción a una infección viral (52), no se halló

evidencia de la asociación entre sus variantes y tales niveles, lo cual puede deberse a que la proteína NS1, como en el caso de otros flavivirus, puede haber inhibido la producción de IFN- γ , impidiendo una efectiva reacción antiviral (53).

Por último, se encontró la asociación entre el rs2069705 y la presencia de trombocitopenia. Dado que este polimorfismo ya había sido relacionado con la gravedad de otras enfermedades infecciosas (54,55), se cree que también tiene implicaciones en la malformación de megacariocitos y la diferenciación en plaquetas, predisponiendo a la trombocitopenia, como ocurre con otras fiebres hemorrágicas (56).

En conclusión, a pesar del tamaño tan pequeño de la muestra, en este trabajo hay indicios de que las variantes en los genes *TNFA*, *IL6* e *IFNG* hacen parte del componente genético que determina la variabilidad de la progresión del dengue.

La medición de las citocinas se hizo en un solo momento en cada individuo, cuando lo ideal es hacer un seguimiento de las evaluaciones en varios momentos, para disminuir la variación y tener una mejor aproximación a la producción de las citocinas.

Agradecimientos

Se agradece a las personas que participaron activamente de esta investigación en el Hospital General de Medellín, en el Hospital Venancio Díaz, la Clínica CES, el Hospital Pablo Tobón Uribe, Saludcoop, la Clínica Medellín, el Hospital Antonio Roldán Betancur, el Hospital Marco Fidel Suárez, el Hospital San Francisco de Asís y el Hospital Ismael Roldán, donde se capturaron los participantes en el estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Financiación

Este trabajo fue financiado por Colciencias, proyectos: No. 325634319263 y No. 111549326145.

Referencias

1. **World Health Organization.** Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO; 2009. p. 3-17.
2. **Mangold KA, Reynolds SL.** A review of dengue fever: A resurging tropical disease. *Pediatr Emerg Care.* 2013;29:665-9. <https://doi.org/10.1097/PEC.0b013e31828ed30e>
3. **Peña-García VH, Triana-Chávez O, Mejía-Jaramillo AM, Díaz FJ, Gómez-Palacio A, Arboleda-Sánchez S.** Infection

rates by dengue virus in mosquitoes and the influence of temperature may be related to different endemicity patterns in three Colombian cities. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13:734. <https://doi.org/10.3390/ijerph13070734>

4. **Normile D.** Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science.* 2013;342:415. <https://doi.org/10.1126/science.342.6157.415>
5. **Rothman AL, Currier JR, Friberg HL, Mathew A.** Analysis of cell-mediated immune responses in support of dengue vaccine development efforts. *Vaccine.* 2014;33:7083-90. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.104>
6. **Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, Téllez Y, Saborio SI, Mercado JC, et al.** Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:449-56.
7. **Murgue B, Roche C, Chungue E, Deparis X.** Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. *J Med Virol.* 2000;60:432-8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(200004\)60:4<432::AID-JMV11>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(200004)60:4<432::AID-JMV11>3.0.CO;2-7)
8. **Halstead SB, Porterfield JS, O'Rourke EJ.** Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. *Am J Trop Med Hyg.* 1980;29:638-42.
9. **Alagarasu K, Damle I, Bachal R, Mulay A, Shah P, Dayaraj C.** Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical outcomes of dengue virus infection in Western India. *Infect Genet Evol.* 2013;17:239-42. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.024>
10. **Restrepo BN, Ramírez RE, Arboleda M, Álvarez G, Ospina M, Díaz FJ.** Serum levels of cytokines in two ethnic groups with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79:673-7.
11. **Malavige GN, Huang LC, Salimi M, Gomes L, Jayaratne SD, Ogg GS.** Cellular and cytokine correlates of severe dengue infection. *PLoS One.* 2012;7:1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050387>
12. **Castro JE, Vado-Solís I, Pérez-Osorio C, Fredeking TM.** Modulation of cytokine and cytokine receptor/antagonist by treatment with doxycycline and tetracycline in patients with dengue fever. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:1-5. <https://doi.org/10.1155/2011/370872>
13. **Gandini M, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Freire Mda S, Galler R, et al.** Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and secretion of different TNF-alpha and IFN-alpha profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106:594-605. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000500012>
14. **Perry ST, Buck MD, Lada SM, Schindler C, Shresta S.** STAT2 mediates innate immunity to Dengue virus in the absence of STAT1 via the type I interferon receptor. *PLoS Pathog.* 2011;7:1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001297>
15. **Restrepo BN, Isaza DM, Salazar CL, Ramírez R, Ospina M, Álvarez LG.** Serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in infants with and without dengue. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41:6-10. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000100002>

16. **Lan NT, Hirayama K.** Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Trop Med Health.* 2011;39:73-81. <http://doi.org/10.2149/tmh.2011-S08>
17. **Sessions OM, Tan Y, Goh KC, Liu Y, Tan P, Rozen S, et al.** Host cell transcriptome profile during wild-type and attenuated dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002107>
18. **Loeb M.** Genetic susceptibility to west Nile virus and dengue. *Public Health Genomics.* 2013;16:4-8. <https://doi.org/10.1159/000345934>
19. **Balding DJ.** A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet.* 2006;7:781-91. <https://doi.org/10.1038/nrg1916>
20. **Harapan H, Jonny KF, Nur W, Jay RA, Lavanya N, Kurnia FJ.** Non-HLA gene polymorphisms and their implications on dengue virus infection. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 2013;14:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2012.08.003>
21. **Cansancao IF, Carmo AP, Leite RD, Rabenhorst SH.** Association of polymorphisms in IL1beta -511C>T, IL1RN 86 bp VNTR, and IL6 -174G>C Genes with clinical dengue signs and symptoms in Brazilian dengue patients. *Viral Immunol.* 2016;29:372-6. <https://doi.org/10.1089/vim.2015.0082>
22. **Woo P, Humphries SE.** IL-6 polymorphisms: A useful genetic tool for inflammation research? *J Clin Invest.* 2013; 123:1413-4. <https://doi.org/10.1172/JCI67221>
23. **Moreira LO, Zamboni DS.** NOD1 and NOD2 signaling in infection and inflammation. *Front Immunol.* 2012;3:1-12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00328>
24. **Fernández-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z.** TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens.* 2004;64:469-72. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2004.00304.x>
25. **He JR, Chen LJ, Su Y, Cen YL, Tang LY, Yu DD, et al.** Joint effects of Epstein-Barr virus and polymorphisms in interleukin-10 and interferon-gamma on breast cancer risk. *J Infect Dis.* 2011;205:64-71. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir710>
26. **Pérez AB, Sierra B, García G, Aguirre E, Babel N, Álvarez M, et al.** Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta1, and interleukin-10 gene polymorphisms: Implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol.* 2010;71:1135-40. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.08.004>
27. **Galanter JM, Fernández-López JC, Gignoux CR, Barnholtz-Sloan J, Fernández-Rozadilla C, Via M, et al.** Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas. *PLoS Genet.* 2012;8:1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002554>
28. **World Health Organization.** Dengue haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO; 1997. p. 12-23.
29. **BlacksellSD, JarmanRG, GibbonsRV, Tanganuchitcharnchai A, Mammen MP Jr., Nisalak A, et al.** Comparison of seven commercial antigen and antibody enzyme-linked immunosorbent assays for detection of acute dengue infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19:804-10. <https://doi.org/10.1128/CVI.05717-11>
30. **Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV.** Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30:545-51.
31. **Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, et al.** Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2634-9.
32. **Sambrook J, Russell DW.** Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.* 2006; 2006:p.ii. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4455>
33. **Molokhia M, Hoggart C, Patrick AL, Shriver M, Parra E, Ye J, et al.** Relation of risk of systemic lupus erythematosus to west African admixture in a Caribbean population. *Hum Genet.* 2003;112:310-8. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0883-3>
34. **Shriver MD, Parra EJ, Dios S, Bonilla C, Norton H, Jovel C, et al.** Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum Genet.* 2003;112:387-99. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0896-y>
35. **Chacón-Duque JC, Adhikari K, Avendaño E, Campo O, Ramírez R, Rojas W, et al.** African genetic ancestry is associated with a protective effect on dengue severity in colombian populations. *Infect Genet Evol.* 2014;27:89-95. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.003>
36. **McKeigue PM, Carpenter JR, Parra EJ, Shriver MD.** Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach: Application to African-American populations. *Ann Hum Genet.* 2000;64:171-86. <https://doi.org/10.1017/S000348000008022>
37. **Zhivotovsky LA.** Relationships between Wright's F ST and F IS statistics in a context of Wahlund effect. *J Hered.* 2015;106:306-9. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv019>
38. **Chua KB, Mustafa B, Abdul AH, Chem YK, Khairul AH, Kumarasamy V, et al.** A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on single-acute serum samples for laboratory confirmation of acute dengue. *Malays J Pathol.* 2011;33:13-20.
39. **Blanton RE, Silva LK, Morato VG, Parrado AR, Dias JP, Melo PR, et al.** Genetic ancestry and income are associated with dengue hemorrhagic fever in a highly admixed population. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:762-5. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.4>
40. **Clark TG, Diakite M, Auburn S, Campino S, Fry AE, Green A, et al.** Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha polymorphisms and severe malaria in African populations. *J Infect Dis.* 2009;199:569-75. <https://doi.org/10.1086/596320>
41. **Ng DP, Nurbaya S, Ye SH, Krolewski AS.** An IL-6 haplotype on human chromosome 7p21 confers risk for impaired renal function in type 2 diabetic patients. *Kidney Int.* 2008;74:521-7. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.202>
42. **Farhat SB, de Souza CM, Braosi AP, Kim SH, Tramontina VA, Papalexou V, et al.** Complete physical mapping of IL6 reveals a new marker associated with chronic periodontitis. *J Periodontol Res.* 2016. <https://doi.org/10.1111/jre.12389>
43. **Qi L, van Dam RM, Meigs JB, Manson JE, Hunter D, Hu FB.** Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: Tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. *Hum Mol Genet.* 2006;15:1914-20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl113>

44. **Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W.** Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:1334-9. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.3.6555>
45. **Stahl EA, Wegmann D, Trynka G, Gutiérrez-Achury J, Do R, Voight BF, et al.** Bayesian inference analyses of the polygenic architecture of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2012;44:483-9. <https://doi.org/10.1038/ng.2232>
46. **Restrepo BN, Ramírez R, Agudelo-Flórez PM, Avendaño-Tamayo E, Chacón-Duque JC, Rojas W, et al.** Características clínicas y niveles de citocinas en pacientes con dengue y su relación con la raza. *Rev Biomed.* 2010;21:137-47.
47. **Silva LK, Blanton RE, Parrado AR, Melo PS, Morato VG, Reis EA, et al.** Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *Eur J Hum Genet.* 2010;18:1221-7. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.98>
48. **Rachman A, Rinaldi I.** Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. *Acta Med Indones.* 2006;38:105-8.
49. **Woodson SE, Freiberg AN, Holbrook MR.** Coagulation factors, fibrinogen and plasminogen activator inhibitor-1, are differentially regulated by yellow fever virus infection of hepatocytes. *Virus Res.* 2013;175:155-9. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.04.013>
50. **Rausch SM, Clark MM, Patten C, Liu H, Felten S, Li Y, et al.** Relationship between cytokine gene single nucleotide polymorphisms and symptom burden and quality of life in lung cancer survivors. *Cancer.* 2010;116:4103-13. <https://doi.org/10.1002/cncr.25255>
51. **Sinha S, Mishra SK, Sharma S, Patibandla PK, Mallick PK, Sharma SK, et al.** Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcγRIIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. *Malar J.* 2008;7:1-11. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-13>
52. **He JR, Chen LJ, Su Y, Cen YL, Tang LY, Yu DD, et al.** Joint effects of Epstein-Barr virus and polymorphisms in interleukin-10 and interferon-gamma on breast cancer risk. *J Infect Dis.* 2012;205:64-71. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir710>
53. **Ye J, Zhu B, Fu ZF, Chen H, Cao S.** Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine.* 2013;31:461-71. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.015>
54. **Kim K, Cho SK, Sestak A, Namjou B, Kang C, Bae SC.** Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1247-50. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.117572>
55. **Wang D, Zhong X, Huang D, Chen R, Bai G, Li Q, et al.** Functional polymorphisms of interferon-gamma affect pneumonia-induced sepsis. *PLoS One.* 2014;9:1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087049>

Cuadro suplementario 1. Protocolo para el diagnóstico del serotipo infeccioso y cebadores para amplificar las regiones en los genes candidatos evaluados

Protocolo de amplificación de los serotipos DENV-1 a DENV-4

140 µl de suero para extraer el ARN viral empleando un estuche comercial (QIAamp Viral RNA kit de Qiagen). Eluido con 60 µl de solución tampón, el ARN se almacenó a -80 °C hasta su uso. La RT-PCR se realizó en una sola reacción. La mezcla fue la siguiente: 10 µl ARN molde y cinco cebadores (D1 y TS1 a 0,5 µM, los cebadores TS2, TS3 y DEN4 a 0,25 µM). Además, 0,5 U de la RT (marca AMVRT promega), 0,625 U de la enzima ADN polimerasa (marca GoTaq Hot Start), 3,5 µl de solución tampón 5X (Green GoTaq flexibuffer), 2,6 mM de MgCL2 (marca Promega), los desoxinucleótidos trifosfato (DNTP) en una concentración de 150 µM en un total de 35 µl de volumen. La reacción de transcripción inversa se hizo a 42 °C por 60 minutos, seguidos de un ciclo inicial de desnaturalización de la RT y activación de la ADN polimerasa a 95 °C por 5 minutos; luego 40 ciclos a 95 °C por 15 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 minuto y 72 °C por 5 minutos de extensión. La amplificación se hizo en un termociclador de marca Bio-Rad C1000. Después de la amplificación, un producto de 10 µl fue resuelto por electroforesis en agarosa al 2 % en solución TBE 1x con un marcador de peso molecular de 50 pb (GeneRuler, Fermentas), con el fin de determinar el serotipo infeccioso por diferencias en el tamaño de la banda de amplificación (DENV-1 482pb, DENV-2 119pb, DENV-3 290pb y DENV-4 389pb).

Iniciadores utilizados para amplificar las regiones de los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en los genes candidatos evaluados

TNFA: directo 5'-CCAGGCTTGTCCTGCTAC-3' y reverso 5'-CCGGATCATGCTTTCAGTG-3'; *IL6*: directo 5'-TCCTGCCTCTGCCATTCT-3' e inverso 5'-TCACCATCCCTTTAGGATCTG-3'; *IFNG*: directo 5'-TCAAGCCAGTTTACAGGTAAGG-3' e inverso 5'-GAGAATGGCTTGAACCCAGA-3'.

Cuadro suplementario 2. Diferencias en las frecuencias delta en cada uno de los 19 marcadores de componente genético ancestral usados para este estudio

Marcador	Africano (AF)	Europeo (EU)	Amerindio (AM)	d ^a AF-EU	d ^a AF-AM	d ^a EU-AM
FY-NUL	0,001	0,998	1,000	0,997	0,999	0,002
AT3	0,858	0,282	0,061	0,576	0,797	0,221
MID1752	0,560	0,290	0,920	0,270	0,360	0,630
GCF	0,853	0,156	0,339	0,697	0,514	0,183
GCS	0,931	0,393	0,458	0,538	0,473	0,065
MID1386	0,770	0,730	0,070	0,040	0,700	0,660
MID817	0,960	0,650	0,130	0,310	0,830	0,520
MID1039	0,980	0,270	0,830	0,710	0,150	0,560
MID944	0,890	0,390	0,950	0,500	0,060	0,560
MID856	0,660	0,150	0,690	0,510	0,030	0,540
MID1358	0,800	0,060	0,040	0,740	0,760	0,020
MID104	0,560	0,350	0,110	0,210	0,450	0,240
MID1066	0,840	0,280	0,260	0,560	0,580	0,020
DRD2	0,135	0,670	0,045	0,535	0,090	0,625
APOA1	0,420	0,925	0,977	0,505	0,557	0,052
PV92	0,225	0,152	0,792	0,073	0,567	0,640
MID818	0,090	0,780	0,980	0,690	0,890	0,200
Sb19.3	0,415	0,903	0,645	0,488	0,230	0,258
MID154	0,820	0,250	0,140	0,570	0,680	0,110

La frecuencia pertenece al alelo de mayor tamaño (alelo 1), equivalente a la inserción en las inserciones-delecciones, y a la ausencia de sitio de corte en los RFLP. ^a d: diferencia delta entre las frecuencias alélicas. Estas frecuencias se tomaron de las respectivas poblaciones ancestrales reportadas para estos polimorfismos en el *National Center for Biotechnology Information*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Cuadro suplementario 3. Descripción detallada de los 19 marcadores de componente genético ancestral usados en el presente estudio

Marcador	Posición	SNP ^a	Ins ^b	Ta ^c (pb)	Enzima	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')
FY-NUL	1q23.2	T/C		172, (152/20)	RsaI	AGGCTGTGCAGGCAGTG	GGCATAGGGATAAGGGACT
AT3	1q25.1	I/D	68	572, 504	N/A ^d	CCACAGGTGTAACATTGTGT	GAGATAGTGTGATCTGAGGC
MID1752	1p32.3	I/D	35	139, 104	N/A ^d	TGTTTGTACCTCCAAGTCTCT	AGATTGACATTCTTCCACA
GCF	4q13.13	T/G		200, (121/79)	HaeIII	AGATCTGAAATGGCTATTATTTTGC	GAGGTGAGTTTATGGAACAGC
GCS	4q13.13	G/T		200, (128,72)	StyI	AGATCTGAAATGGCTATTATTTTGC	GAGGTGAGTTTATGGAACAGC
MID1386	4q21.3	I/D	6	109, 103	N/A ^d	GTTATGTGGGCAGTGTTTTC	CCACAGAAGGCTCAGTCTTA
MID817	5p15.2	I/D	23	140, 117	N/A ^d	ATTACCGGAACACATTCTGA	CCTACATCCAACAGAAGGTG
MID1039	5p13.13	I/D	40	128, 88	N/A ^d	CGTTTTCATCTCTTTGGGTTA	GCTTTCTTCATTCTTCCACA
MID944	5q14.3	I/D	30	140, 110	N/A ^d	TCAGTAAAAGGGTTTCCTTGT	GTAAGCAGCCTGGATTACAA
MID856	5q12.13	I/D	26	112, 138	N/A ^d	AACATGGGAAGTCTCATT	TATTGTGCTCATTCTGGG
MID1358	5p13.2	I/D	17	125, 108	N/A ^d	GTTTGGGAATTTAGGTTTTG	AGACGCCAGGAATTTCTAT
MID104	6p21.32	I/D	5	126, 121	N/A ^d	CAGAGGGTCTAGAGCAAAATT	CCTTAGCTCAGTATGCTCCA
MID1066	7p15.1	I/D	19	103, 84	N/A ^d	TCTTGGGACTCAGAGTTCAG	CAGAAACCAAGGTGAAAGTG
DRD2	11q23.3	C/T		300 (211/89)	TaqI	CCGTCGACCCCTCTGAGTGTCA	CCGTCGACGGCTGGCCAAGTTGTCTA
APOA1	11q24.2	I/D	301	409, 108	N/A ^d	AAGTGTGTAGGCCATTTAGATTAG	AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA
PV92	16q24.3	I/D	300	716, 416	N/A ^d	AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT	TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG
MID818	16p13.13	I/D	24	143, 119	N/A ^d	TAGAGCCAGTTAGAGGGAGG	ACTTCAGTCGCTCACTCCATC
Sb19.3	19p11	I/D	311	767, 456	N/A ^d	TCTAGCCCCAGATTTATGGTAACTG	AAGCACAATTTGGTTATTTCTGAC
MID154	20q11.22	I/D	26	147, 121	N/A ^d	GGCTCTGACTGAGAAAAGTGA	AACAGGCAATCCTCCTAAGT

^a SNP: polimorfismo de nucleótido simple; ^b Ins: tamaño de la inserción en pb; ^c Ta: tamaño del alelo en pares de bases (pb); ^d N/A: no aplica

Cuadro suplementario 4. Proporciones de los componentes africano, europeo y amerindio calculadas para las dos poblaciones y la muestra completa a partir de los AIM

Autoidentificación	Componente ancestral / media ± DE; mediana, 25:75		
	Europeo	Amerindio	Africano
Afro-colombiano, n=122	0,150±0,125; 0,10, 0,07: 0,16 ^a	0,098±0,121; 0,13, 0,10: 0,18 ^a	0,75±0,184 0,76, 0,64: 0,8 ^a
Mestizos, n=104	0,652±0,100; 0,52, 0,48: 0,56 ^a	0,193±0,075; 0,39, 0,35: 0,46 ^a	0,155±0,081; 0,06, 0,04: 0,08 ^a
Muestra completo, n=226	0,382±0,275	0,142±0,113	0,476±0,332

^a Recurso: Galanter, *et al.* (28). Los componentes genéticos ancestrales están dados en media ± desviación estándar (DE); mediana y percentiles 25:75 (24).

Cuadro suplementario 5. Frecuencias alélicas y equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra completa y ajustada por auto-identificación

Gen	SNP ^a	MAF ^b	Muestra completa	Autoidentificación			Población ancestral (NCBI)		
				Afrocolombiano	Mestizo	Europea ^d	Amerindia ^d	Africana ^d	
<i>TNFA</i>	rs1800750	A	0,0381 ^c	0,0333	0,0437	0,009	0,050	0,004	
<i>IL6</i>	rs2069843	A	0,0942	0,1134	0,0721	0,013	0,080	0,146	
<i>IFNG</i>	rs2069705	T	0,4797	0,4667	0,4951	0,624	0,410	0,536	

^a SNP: polimorfismo de nucleótido simple; ^b MAF: alelo de menor frecuencia (MAF) reportado en la base de datos internacional del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; ^c Esta variante para esta población se encontró por fuera del equilibrio debido a exceso de heterocigotos; ^d Frecuencias alélicas en las poblaciones con origen europeo, amerindio o africano reportadas en el NCBI.