



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

LUANA WEBER LOPES

**CONCENTRAÇÕES ELEVADAS DAS CITOCINAS ASSOCIADAS À
RESPOSTA Th17 E DESFECHOS DESFAVORÁVEIS EM PACIENTES
COM COVID-19 ADMITIDOS À UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA**

Vitória da Conquista, BA
2024

LUANA WEBER LOPES

**CONCENTRAÇÕES ELEVADAS DAS CITOCINAS ASSOCIADAS À
RESPOSTA Th17 E DESFECHOS DESFAVORÁVEIS EM PACIENTES
COM COVID-19 ADMITIDOS À UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Freire de Melo Universidade Federal da
Bahia – UFBA

Co-orientador: Prof. Dr^a Dulciene Maria de Magalhães Queiroz
Faculdade de Medicina da UFMG

Vitória da Conquista, BA
2024

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

L864

Lopes, Luana Weber.

Concentrações elevadas das citocinas associadas à respostas Th17 e desfechos desfavoráveis em pacientes com COVID-19 admitidos à Unidade de Terapia Intensiva / Luana Weber Lopes. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2024.

42 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Freire de Melo.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociências) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2024.

1. SARS-CoV-2. 2. Citocinas. 3. Células Th17. 4. COVID-19 I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Melo, Fabrício Freire de. III. Título.

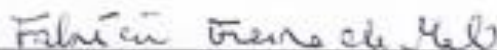
CDU: 578.834(813.8)(043.3)

LUANA WEBER LOPES

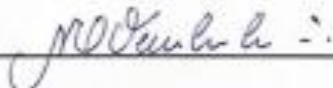
CORRELAÇÃO EM CONCENTRAÇÕES ELEVADAS DAS CITOCINAS ASSOCIADAS À RESPOSTA Th17 E DESFECHOS DESFAVORÁVEIS EM PACIENTES COM COVID-19 ADMITIDOS À UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 15/04/2024.



Prof. Dr. Fabrício Freire de Melo (Orientador)
(Universidade Federal da Bahia)



Prof. Dr. Márcio Vasconcelos Oliveira (Examinador)
(Universidade Federal da Bahia)



Prof. Dr. Pedro Fonseca de Vasconcelos (Examinador)
(Faculdade Independente do Nordeste)

Dedico este trabalho a todos que, de
alguma forma, fizeram parte dessa jornada.
Aos participantes da pesquisa, amigos e familiares.
Aos que me motivaram e acreditaram
na minha capacidade.
Mas, principalmente, ao meu pai de alma,
Absolom, sem você eu não teria chegado
até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades concedidas a mim, pela força e tranquilidade nos momentos de fraqueza e dificuldades.

Ao Professor Fabrício Freire, meu orientador por total apoio e disponibilidade, incentivo, pela partilha do seu grandioso conhecimento. Me espelho em você.

Ao Instituto Multidisciplinar em Saúde com todo o suporte estrutural e tecnológico de grande importância para a construção desse trabalho. E aos colaboradores dos Laboratórios por todo suporte prestado, em especial a Janeide.

Aos meus professores universitários por servirem como fonte de inspiração, sem vocês eu não teria todo esse interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.

A todos os alunos de iniciação científica que participaram desta pesquisa, por sempre estarem a disposição para ajudar e contribuir. Vocês me ensinaram, incentivaram e colaboraram muito com o resultado final deste trabalho. À Fabian, por toda contribuição e ensinamento que me foi passado na fase final desse trabalho.

À toda a minha família, em especial ao meu padrasto, Absolom, pelo seu apoio incondicional, incentivo, e por todo amor dedicado a mim, por me ensinar a nunca desistir dos meus sonhos e acreditar na minha capacidade sempre. À minha mãe, minha companheira de vida que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e orientando sempre o melhor caminho. Minha irmã, Maria Clara por todo apoio, diversão e incentivo. À Anna Clara, minha irmã, sem a sua direção e encaminhamento eu não teria chegado onde cheguei.

Aos membros da banca (Márcio Vasconcelos e Pedro Vasconcelos) por suas importantes contribuições científicas com sugestões para o aprimoramento desse estudo.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectualmente e emocionalmente.

LOPES, Luana Weber. Concentrações elevadas das citocinas associadas à respostas Th17 e desfechos desfavoráveis em pacientes com COVID-19 admitidos à Unidade de Terapia Intensiva. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

RESUMO

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Sabe-se, hoje, que a resposta imunológica desempenha um papel fundamental na modulação da gravidade e desfecho dessa doença; e, nesse contexto, a resposta Th17 tem recebido crescente atenção devido à sua capacidade de modulação da inflamação. Foram incluídos prospectivamente 56 pacientes com COVID-19 admitidos à UTI do Hospital Geral de Vitória da Conquista (HGVC) – Bahia, Brasil. Todos os pacientes incluídos tiveram a infecção por SARS-CoV-2 confirmada por meio de PCR em tempo real (RT-PCR) de amostras de swab nasofaríngeo. Coletou-se amostras de soro de todos os participantes para determinação da concentração sérica de citocinas associadas à resposta Th17 (IL-1 β , TGF- β e IL-6, IL-17 e IL-23) *via* ELISA (ensaio imunoenzimático). Foi utilizado teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade da distribuição dos dados, a homogeneidade de variância foi verificada por meio do teste de Levene. O teste t de Student foi utilizado para comparações de médias. Realizou-se testes qui-quadrado de independência (2x2) para associações entre variáveis categóricas. Por fim, avaliamos as associações entre as citocinas e a variável de desfecho mortalidade utilizando-se correlação de Spearman. Foi demonstrado inicialmente que pacientes do sexo masculino apresentavam mais chances de vir a óbito quando comparados com pacientes do sexo feminino. Observou-se que pacientes falecidos apresentaram níveis mais elevados de IL-1 β e IL-6 comparados com pacientes que receberam alta, em relação ao TGF- β os pacientes falecidos apresentaram níveis séricos substancialmente elevados comparados ao grupo. Embora não tenha sido observadas diferenças estatisticamente significativas foi notada uma tendência de níveis mais elevados de IL-17 e IL-23 em pacientes que evoluíram ao óbito. A IL-1 β e TGF- β revelaram uma correlação significativa de forte magnitude com o desfecho morte, já a IL-6 apresentou uma correlação moderada. Quanto as correlações das citocinas entre si encontraram-se uma correlação significativa forte da IL-1 β com TGF- β . A IL-6 também demonstrou uma correlação significativa forte com a IL-17 e com a IL-23, bem como de moderada magnitude com TGF- β . Por fim, IL-17 e IL-23 exibiram uma correlação significativa de entre si. Com base em nossa análise, concluímos que elevados níveis das citocinas IL-1 β , TGF- β e IL-6 estão significativamente associados a um desfecho desfavorável em pacientes com SARS-CoV-2, independentemente das comorbidades presentes. Essas citocinas podem desempenhar um papel importante na patogênese da doença e podem ser indicadores úteis para avaliar a gravidade e o prognóstico dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2.

Palavras-chaves: SARS-CoV-2. Citocinas. Resposta Th 17.

LOPES, Luana Weber. Concentrações elevadas das citocinas associadas à respostas Th17 e desfechos desfavoráveis em pacientes com COVID-19 admitidos à Unidade de Terapia Intensiva. Master Dissertation – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

ABSTRACT

COVID-19 is an infectious disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). It is now understood that the immune response plays a crucial role in modulating the severity and outcome of this disease. In this context, the Th17 response has been receiving increasing attention due to its ability to modulate inflammation. A prospective inclusion of 56 COVID-19 patients admitted to the Intensive Care Unit (ICU) of the General Hospital of Vitória da Conquista (HGVC) in Bahia, Brazil, was conducted. All included patients had SARS-CoV-2 infection confirmed through real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) of nasopharyngeal swab samples. Serum samples were collected from all participants to determine the concentration of Th17-associated cytokines (IL-1 β , TGF- β , IL-6, IL-17, and IL-23) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The Shapiro-Wilk test assessed the normality of data distribution, and Levene's test verified variance homogeneity. Student's t-test was employed for mean comparisons, and chi-square independence tests (2x2) examined associations between categorical variables. Lastly, Spearman correlation evaluated associations between cytokines and the mortality outcome variable. It was initially demonstrated that male patients had a higher likelihood of mortality compared to female patients. Deceased patients exhibited higher levels of IL-1 β and IL-6 compared to those discharged, while TGF- β levels in deceased patients were substantially elevated. Although statistically significant differences were not observed, there was a trend of higher levels of IL-17 and IL-23 in patients who succumbed to mortality. IL-1 β and TGF- β showed a significant strong correlation with the mortality outcome, while IL-6 presented a moderate correlation. Strong significant correlations were found between IL-1 β and TGF- β , as well as between IL-6 and IL-17, and IL-6 and IL-23, with a moderate correlation observed between IL-6 and TGF- β . Finally, IL-17 and IL-23 exhibited a significant correlation with each other. Based on our analysis, we conclude that elevated levels of cytokines IL-1 β , TGF- β , and IL-6 are significantly associated with an unfavorable outcome in SARS-CoV-2 patients, irrespective of comorbidities. These cytokines may play a crucial role in the pathogenesis of the disease and serve as useful indicators for assessing the severity and prognosis of SARS-CoV-2-infected patients.

Keywords: SARS-CoV-2. Cytokines. Response Th17.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC Células Apresentadoras de Antígenos

E Envelope

ECA 2 Enzima Conversora de Angiotensina 2

G-CSF Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos

HLH Linfocitose Hemofagocítica Secundária

IL- Interleucina

ILC Células Linfoides Inatas

INF- Interferon

IP10 Proteínas 10 induzidas

LPS Lipossacarídeo

M Membrana

MCP-1 Proteína Quimiotática de Monócitos 1

MERS-CoV-2 Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio

MyD88 Mieloide 88

N Nucleocapsídeo

NK Células Natural Killer

NLRs do inglês, *NOD-like receptors*

PAMPs Padrões Moleculares Associados ao Patógeno

PCR Proteína C Reativa

PRRs Receptores de Reconhecimento de Padrões

RIG-I Gene I Induzível por Ácido Retinóico

ROR do inglês, *retinoid orphan nuclear receptor*

S do inglês, *spike*

SARS-CoV-1 Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 1

SARS-CoV-2 Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

SDRA Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

Tc Linfócito T Citotóxico

TGF Fator de Transformação do Crescimento

Th Linfócito T Auxiliar

TLR Receptor do Tipo Toll

TMPRSS2 Serina Protease Transmembrana Tipo 2

TNF Fator de Necrose Tumoral

Treg Linfócito T Regulatório

TRIF Indutor de Adaptador Contendo Domínio TIR

UTI Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Características gerais do vírus e patogênese.....	12
2.2 Resposta imune inata ao SARS-CoV-2.....	14
2.3 Resposta imune adaptativa ao SARS-CoV-2	15
2.4 Linfócitos Th17	16
2.5 Resposta imune associada à tempestade de citocinas.....	18
3 OBJETIVO GERAL	19
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
Desenho do estudo e seleção de pacientes.....	19
Coleta de dados clínico-demográficos.....	20
Amostragem de plasma	20
Análise de Citocinas no Plasma	20
Análise estatística	21
5 REFERÊNCIAS	21
6 PRODUTO CIENTÍFICO	25
6.1 Artigo único.....	25
INTRODUCTION	26
PATIENTS AND METHODS	28
Study design and patient selection.....	28
Plasma sampling.....	28
Plasma cytokine analysis.....	29
Statistical analysis	29
RESULTS	29
Clinical and demographic characteristics of patients	29
Comparative analysis of laboratory parameters	31
Comparative analysis of cytokine levels by outcome	32
Correlation of specific cytokines with COVID-19-related mortality and association between cytokines.....	33
DISCUSSION	35
REFERENCES	38

1 INTRODUÇÃO

A COVID-19, doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave), disseminou-se em escala pandêmica desde o relato do primeiro caso em Wuhan, China, em 2019 (HUANG *et al.*, 2020). O SARS-CoV-2 é um betacoronavírus, consiste em um vírus não segmentado, envelopado e com diâmetro variando de 60 a 140 nm (MITTAL *et al.*, 2020). O genoma é constituído de RNA de fita simples, que possui semelhança filogenética com o coronavírus 1 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-1) que causou surto em 2003 (OMS, 2022).

A maioria dos pacientes com COVID-19 os sintomas são mais leves, como febre, dor de cabeça e tosse, não exigindo internação. Cerca de 14% dos pacientes desenvolvem desconforto respiratório grave. No entanto, pacientes com COVID-19 grave podem ter inflamação sistêmica e lesão tecidual, como síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), tromboembolismo, manifestações neurológicas, lesão cardíaca e falência de órgãos (HUANG *et al.*, 2020; KARKI; KANNEGANTI, 2021).

A COVID-19 grave pode desencadear uma resposta imunológica excessiva, com produção maciça de citocinas inflamatórias e mediadores químicos, conhecida como “tempestade de citocinas” (MANIK *et al.*, 2020; QU *et al.*, 2020, BERGANTINI *et al.*, 2020). Essa condição é considerada uma resposta inflamatória sistêmica descontrolada mediada principalmente pela resposta inata do sistema imunológico (MCGONAGLE *et al.*, 2020; AHMADPOOR *et al.*, 2020).

Citocinas se elevam durante a síndrome da resposta inflamatória sistêmica podendo levar à falência de múltiplos órgãos. Pacientes apresentam altas contagens de neutrófilos e baixo número de linfócitos no sangue, além de níveis elevados de marcadores inflamatórios, incluindo proteína C reativa (PCR), ferritina e dímero D (QIN C *et al.*, 2020).

Estudos recentes relatam relação entre os níveis séricos de citocinas inflamatórias e a gravidade ou prognóstico da COVID-19 (GONG *et al.*, 2020; TOHWA *et al.*, 2020). Foram relatadas quantidades consideravelmente elevadas de citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, fator de necrose tumoral (TNF) e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e em pacientes hospitalizados com doença grave (MARTONIK *et al.*, 2020; CATANZARO *et al.*, 2020; TANG Y *et al.*, 2020; HOJYO *et al.*, 2020; BORDONI *et al.*, 2020; LI H *et al.*, 2020; TAY M *et al.*, 2020; DE BIASI *et al.*, 2020; SCHULTHEIR *et al.*, 2020; YE Q *et al.*, 2020).

Além disso, foi observado que a baixa ativação das células Th1 está associada a um mau prognóstico da doença em estando mais frequentemente presente nos pacientes com COVID-19 graves que naqueles com quadros leves (GIL-ETAYO *et al.*, 2021; ALEEBRAHIM *et al.*, 2022). Estudos anteriores sugeriram que em comparação com COVID-19 leve, a expansão aumentada de neutrófilos periféricos em COVID-19 grave potencialmente suprime a diferenciação de células Th1 e desencadeia a polarização de células Th17 (PARACKOVA *et al.*, 2021).

Evidências crescentes sugerem que as células Th17 desempenham um papel importante na patogênese da COVID-19, não apenas ativando a cascata de citocinas, mas também induzindo respostas Th2, inibindo a diferenciação de Th1 e suprimindo células Treg. (TOH *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2008; MARTONIK *et al.*, 2021). A diferenciação de células Th17 depende dos fatores de transcrição STAT3 e ROR γ t (*retinoid orphan nuclear receptor*) e das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-23 e TGF- β (KOR *et al.*, 2008; KORN *et al.*, 2009; JIN; DONG, 2013). As células Th17 produzem quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como IL-17A, IL-17F e IL-6 que atuam na resposta imunológica. Dessa forma, foi objetivo desse estudo avaliar a possível associação das citocinas envolvidas na diferenciação das células Th17 (IL-1 β , TGF- β , IL-6, IL-17 e IL-23) com o curso da doença e o desfecho de pacientes com COVID-19.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais do vírus e patogênese

O COVID-19 causada pelo SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave) foi disseminado inicialmente na cidade de Wuhan, na China em dezembro de 2019 quando casos de pneumonia viral grave foram considerados com sendo por transmissão zoonótica. O primeiro caso de COVID-19 foi reconhecido no dia 31 de dezembro de 2019 (TAN *et al.*, 2020). Logo em seguida, 41 pessoas que entraram em contato com casos suspeitos foram diagnosticadas com COVID-19 em Wuhan (PAHO *et al.*, 2020). Em seguida, França e Estados Unidos demonstraram que a infecção se disseminará para outros continentes e A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu a situação de pandemia global em março de 2020 (WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

SARS-CoV-2 é o sétimo coronavírus identificado que acomete seres humanos. Em 2002, um coronavírus de origem zoonótica, muito patogênico - coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) foram identificados em seres humanos e causaram

doença respiratória, ocorrendo em 2013 o surgimento da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (HU *et al.*, 2021; LU *et al.*, 2020). Há semelhança genética entre os dois betacoronavírus de 76% (HOFFMANN *et al.*, 2020)

O SARS-CoV-2 é um vírus RNA de fita simples, envelopado, com aproximadamente 30 kb de comprimento (MITTAL *et al.*, 2020). O vírus é composto por quatro proteínas estruturais principais, a glicoproteína spike (S), glicoproteína de envelope (E), glicoproteína de membrana (M) e proteína do nucleocapsídeo (N), além de outras proteínas acessórias (ASTUTI; YSRAFIL, 2020).

O principal mecanismo para o vírus adentrar na célula do hospedeiro é a ligação da glicoproteína S com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2), expressa nas células do trato respiratório inferior, mas também expressa em outros locais como, trato gastrointestinal, testículos, rins, coração, tireoide e tecido adiposo (PRINGLE *et al.*, 2011). A Serina Protease Transmembrana Tipo 2 (TMPRSS2) atua como facilitadora para a entrada do coronavírus nas células clivando a proteína S e levando à fusão da membrana viral, permitindo com que o vírus tenha acesso ao citosol (HOFFMANN *et al.*, 2020). Com a liberação do genoma viral têm-se início a transcrição, tradução e síntese do RNA genômico e das proteínas estruturais S, E e M que passam pelo retículo endoplasmático e complexo de Golgi, onde o genoma viral é encapsulado pela proteína N, formando a partícula madura (SHANG *et al.*, 2020). Depois da montagem, as partículas são transportadas para a superfície celular em vesículas e liberadas por exocitose e segue o processo de contaminação e disseminação sistêmica (SHANG *et al.*, 2020; HONG *et al.*, 2021).

O período de incubação do COVID-19 ocorre em torno de 14 dias depois da exposição e o início dos sintomas de quatro a cinco dias depois da inoculação (QIN J *et al.*, 2020). A pneumonia é o achado grave mais frequente e geralmente ocorre com febre, tosse, expectoração e dispneia. Outros sintomas comuns são mialgia, diarreia, anosmia, disgeusia e sintomas do trato respiratório superior (CASCELLA *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2020).

Há risco elevado para desenvolver a forma grave da doença em pessoas acima de 60 anos de idade e com comorbidades, como doenças crônicas renais, hepáticas, neurológicas, respiratórias, cardiovasculares, diabetes mellitus e doenças imunossupressoras (WU C *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020). A desregulação imunológica e a hiperinflamação nessas doenças crônicas podem ser fatores que contribuem para a progressão do COVID-19 (GULER; OZTURK, 2020).

2.2 Resposta imunológica inata ao SARS-CoV-2

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra o SARS-CoV-2. Uma grande quantidade de células participa dessa resposta, incluindo, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células natural killer (NK), eosinófilos, basófilos e células linfoides inatas (ILCs) são ativadas durante a infecção por SARS-CoV-2. A ativação da resposta inata é ativada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões múltiplos (PRRs) que levam à produção de citocinas e quimiocinas. As três principais famílias de PRR incluem receptores do tipo Toll (TLRs), receptores do tipo I induzíveis por ácido retinóico (RIG-I) e receptores semelhantes ao domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NOD) (NLRs) (KARKI *et al.*, 2020).

Estudos apontam que durante a infecção por SARS-CoV-2 esses receptores induzem a produção de citocinas e morte celular imunomediada. O SARS-CoV-2 estimula diretamente as células epiteliais infectadas e células mielóides circulantes para liberarem citocinas pró-inflamatórias (GUO C *et al.*, 2020; QIN G *et al.* 2021). Mesmo as respostas inflamatórias iniciais sendo essenciais para limitar a replicação viral (PARK *et al.*, 2020), o SARS-CoV-2 desenvolve estratégia para escapar da resposta inata, evitando a ativação de PRRs e interferindo negativamente na resposta de interferon (INF).

Os TLR são considerados como guardiões do sistema imunológico humano para proteger o hospedeiro de patógenos invasores. A ligação de TLR com partículas do SARS-CoV-2 estimula vias de sinalização e transdução. A via de diferenciação mielóide 88 (MyD88) estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias. O interferon- β , indutor de adaptador contendo domínio TIR (TRIF), culmina na produção de INF tipo I e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-12 (ABOUDOUNYA *et al.*, 2021; SOHN *et al.*, 2020).

Durante a infecção por SARS-CoV-2 os RLRs estão envolvidos na identificação do RNA viral, inibindo a replicação viral por esse reconhecimento (YIN *et al.*, 2021). No entanto, o SARS-CoV-2 pode inibir a sinalização RLR interferindo na resposta imunológica de uma maneira dependente de ubiquitinação (RAN *et al.*, 2020).

Dentre os NLRs, o mais bem estudado é NLRP3 que leva à formação de inflamassoma. NLRP3 não controlado pode desencadear expressão excessiva de IL-1 β e outras citocinas inflamatórias, levando à morte por piroptose (ZHENG *et al.*, 2020; THEOBALD *et al.*, 2021; RODRIGUES *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2021). A grande concentração de IL-1 β ativada pode estimular respostas inflamatórias sistêmicas, resultando na liberação de grandes quantidades de citocinas, como IL-6, fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon α (INF α) e

INF β . As variantes genéticas do inflamassoma NLRP3 estão associados à COVID-19 grave (ELTOBGY *et al.*, 2022).

2.3 Resposta imunológica adaptativa ao SARS-CoV-2

A imunidade adaptativa eficaz durante infecções virais é essencial para remover partículas virais do hospedeiro, evitar que a doença evolua para estágios graves e, finalmente, recuperar os pacientes. Os linfócitos T auxiliares (TCD 4+) são, em geral, os principais atores da resposta adaptativa provocada por infecções virais. Depois de detecção do vírus, as APCs (células apresentadoras de antígenos) processam e apresentam antígenos virais aos linfócitos TCD4+ e linfócitos citotóxicos (TCD8+). Ao controlar o curso das respostas das células T, as APCs criam um microambiente de citocinas (LOTFI *et al.*, 2021).

Linfócitos TCD4+ atuam principalmente na ativação e regulação de outras células sendo denominados auxiliares (COFFMAN *et al.*, 2006). Esse grupo de células é dividido em subpopulações funcionalmente distintas devido ao repertório de citocinas produzidas (Th1, Th2, Th17 e Treg). Os linfócitos TCD8+, conhecidos como citotóxicos, também desempenham atividades efectoras importantes para a eliminação de patógenos intracelulares (SHRESTA *et al.*, 1998; HARLIN *et al.*, 2009).

Quanto às células Th1, foi observada uma expressão diminuída de INF- γ em células T CD4+ em casos de COVID-19 grave (SADEGHI *et al.*, 2021). Além disso, a hipo-ativação de Th1 está associada a um mau prognóstico da doença, observada em pacientes graves (GIL-ETAYO *et al.*, 2021; ALEBRAHIM *et al.*, 2022).

Células Th2 atuam no contra ponto contra resposta adequada à patógenos extracelulares. Foi demonstrado em um estudo que a hiperativação de Th2 e elevação das citocinas associadas, incluindo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 associaram-se significativamente com a gravidade da COVID-19 e mortalidade a ela associada (GIL-ETAYO *et al.*, 2021). Associação entre ativação aumentada de células Th2 e, mau prognóstico é relatada em pacientes COVID-19 (PARACKOVA *et al.*, 2021; ORLOV *et al.*, 2020).

Pacientes com doença grave, internados em Unidades de Terapia Intensiva apresentam reduções persistentes em todos os subtipos de linfócitos. A infecção por SARS-CoV-2 é capaz de induzir secreção e ativação de citocinas Th2 e Treg como IL-4 e IL-10 com ação anti-inflamatório (AKBARI *et al.*, 2020). IL-10 é uma citocina que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, atuando assim na imunomodulação. Na COVID-19, foi descrita terem papéis antagônicos, pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, mas com funções anti-inflamatórias

positivas na fase adaptativa da resposta imunológica (SAGHAZADEH *et al.*, 2020). Já a IL-4 atua primariamente na ativação, multiplicação e especialização de linfócitos B e na produção de imunoglobulinas IgE. Além disso, a IL-4 está associada à plasticidade metabólica de diferentes tecidos devido à sua ação anti-inflamatória (TSAO *et al.*, 2014). Nesse sentido, a IL-4 pode estar associada a um papel benéfico no controle do COVID-19, inibindo o processo inflamatório (AKBARI *et al.*, 2020).

As células Th2 ativadas produzem ainda IL-13, que atua como um contrarregulador da resposta Th1 e simultaneamente estimulação da síntese de TGF- β que tem sido associada à maior gravidade e maior carga viral (COSTELA *et al.*, 2020).

2.4 Linfócitos Th17

Linfócitos Th17, produtores de IL-17A, IL-17F, dentre outras, são conhecidos por apresentarem perfil pró-inflamatório, com papel relevante na defesa do organismo contra infecções, além de induzirem recrutamento de neutrófilos para o local (DONG *et al.*, 2008).

Para que ocorra a diferenciação de linfócitos TCD4⁺ em Th17, um fator de transcrição específica, o ROR γ t é indispensável. Esta diferenciação ocorre em três diferentes etapas, iniciação, amplificação e estabilização (LI *et al.*, 2017). No tecido inflamado, IL-6 e TGF- β promovem a ativação de ROR γ t que induzem a diferenciação de linfócitos T em linfócitos Th17 (MA *et al.*, 2017). IL-1 β , IL-6 e IL-23 são importantes mediadores com ação de amplificação e estabilização de células Th17 para a manutenção da produção da citocina pró inflamatória IL-17 (IVANOV *et al.*, 2006; NOACK *et al.*, 2014).

A IL-1 β ativa a sinalização da fase aguda, o tráfego de células imunológicas para o local da infecção primária, a ativação de células epiteliais e a produção de citocinas secundárias. A resposta da fase aguda da infecção é evidenciada em uma ampla gama de efeitos locais e sistêmicos geralmente pró-inflamatórios, como a produção de citocinas específicas, que podem estar ligadas a eliminação viral (LICHTMAN *et al.*, 2020).

IL-1 β desempenha papel importante na indução e função de células Th17 (SUTTON *et al.*, 2003). IL-1 β é liberada depois da ligação do SARS-CoV-2 ao receptor de TLR, desencadeia inflamação pulmonar, febre, fibrose e provoca problemas respiratórios graves (CONTI *et al.*, 2020a; CONTI *et al.*, 2020b).

O pleiotrópico TGF- β atua de maneira relevante na regulação das respostas imunológicas, em particular nas mucosas. O TGF- β induz tanto a expressão de FoxP3 quanto ROR γ t em células TCD4⁺. Assim é um fator crítico para indução de células Th17 e células

Treg (FU *et al.*, 2004; TEIXEIRA-SALUM *et al.*, 2009). Assim, na presença de IL-6 e TGF- β , os linfócitos TCD4⁺ diferenciam-se em células Th17. Durante um processo inflamatório, a expressão de FoxP3, também induzida por TGF- β , é reduzida e a expressão de ROR γ t é aumentada, gerando assim um desequilíbrio na relação Th17/Treg (NOACK *et al.*, 2014).

Na COVID-19, a expressão precoce do TGF- β tem consequências patogênicas graves, inibindo a morte de células infectadas por células NK e redirecionando a resposta imunológica em pacientes com doença grave para uma resposta autoimune crônica (WANG *et al.*, 2022; WOODRUFF *et al.*, 2022).

IL-6 citocina pró-inflamatória relevante com efeitos pleiotrópicos. É induzida por infecção ou lesão tecidual e rapidamente induz reações agudas com objetivo de minimizar a infecção e seus efeitos (TANAKA *et al.*, 2014). promove a diferenciação de células TCD4⁺ em células efetoras e auxiliares (DIENNZ, 2009). Por unir a imunidade natural em respostas imunológicas adaptativas, a IL-6 além de promover a diferenciação das células Th17 (IVANOV *et al.*, 2006) atua na ativação e diferenciação citotóxica dos linfócitos TCD8⁺ (YANG *et al.*, 2006). IL-6, também, inibe a produção de células T reguladoras (DOMINITZKI *et al.*, 2007).

Na COVID-19 há aumento elevado de IL-6, que tem sido associado aos piores desfechos na doença (HOILAND *et al.*, 2020; ENGLAND *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020).

TH17 célula pró-inflamatória associada a infecções bacterianas extracelulares, mas não virais, mas em infecções viróticas pode estimular células não específicas da resposta imunológica como fibroblastos e células epiteliais com produção de quantidades aumentadas de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que atraem neutrófilos, com aumento da morbidade, embora ineficiente na prevenção da disseminação do patógeno (RYZHAKOV *et al.*, 2011). IL-17 induz peptídeos antimicrobianos na mucosa que podem contribuir para a formação de edema potencialmente fatal com presença de mucina e fibrina como observada na COVID-19 (WU; YANG, 2020; ZENEWICZ, 2018; TSE *et al.*, 2004).

IL-23 é uma citocina importante para a proliferação e diferenciação da célula Th17, (SMAIL *et al.*, 2023).

Martonik e colaboradores observaram proporção de células Treg/Th17 diminuída em pacientes com COVID-19 grave em decorrência de menor número de células Treg, o que contribui para uma regulação insuficiente da resposta pró-inflamatória (QI *et al.*, 2020). Há, então, aumento da inflamação sistêmica com complicações pulmonares (Lesão Pulmonar Aguda e SDRA), decorrente da produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias (LIN *et al.*, 2018; YU Z *et al.*, 2015).

2.5 Resposta imunológica associada à tempestade de citocinas

Acredita-se que as citocinas desempenham um papel muito importante na imunopatologia durante a infecção viral. Uma resposta inata rápida e bem controlada é a primeira linha de defesa contra a infecção viral. No entanto, respostas desreguladas e excessivas podem causar lesões imunológicas ao organismo (YANG *et al.*, 2020; BEHRENS *et al.*, 2017; CHANNAPPANAVAR *et al.*, 2016). Foi demonstrado por Blanco e colaboradores (2020) que células infectadas pelo SARS-CoV-2 têm menor capacidade de produzir INFs, mediadores-chaves para uma resposta antiviral adequada. Ao mesmo tempo produzem níveis elevados de citocinas que recrutam neutrófilos e macrófagos com aumento da liberação de citocinas (BLANCO *et al.*, 2020).

Há estudos demonstrando que na vigência de “tempestade de citocinas” na COVID-19 decorrente de falha no sistema imunológico para eliminar o vírus. “Tempestade de citocinas” pode ser dividida em dois estágios. No primeiro ocorre imunodeficiência temporária que é semelhante à HLH (Linfocitose hemofagocítica secundária) primária. O segundo estágio é caracterizado por hiperatividade imunológica para compensar a falha na eliminação viral, considerado manifestação clínica da “tempestade de citocinas” (MCGONACLE *et al.*, 2020).

Pacientes com doença grave, admitidos na Unidade de Terapia Intensiva produzem níveis elevados de várias citocinas e quimiocinas IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, MIP1- α e TNF- α (HUANG *et al.*, 2020).

Um estudo realizado na China avaliou o nível sérico de 48 citocinas e quimiocinas em uma coorte de 74 pacientes, incluindo casos assintomático, leves, moderados e graves de pacientes com COVID-19 confirmada. Foi possível observar que a infecção pelo SARS-CoV-2 foi um indutor potente de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que podem estar envolvidas na defesa contra infecções virais, mas também podem mediar a lesão pulmonar destrutiva. Foi possível observar também que o perfil circulante de citocinas e quimiocinas voltaram ao normal depois da recuperação (CHI *et al.*, 2020).

Em uma meta-análise que avaliou 77 estudos incluindo 13.986 pacientes, foi identificado que os níveis séricos de IL-6, IL-2R, TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-8 e IL-17 foram significativamente mais elevados nos casos graves e em pacientes que evoluíram para o óbito, atuando como fator crucial na progressão da COVID-19. Identificaram ainda a IL-6 como agente central para “tempestade de citocina” desempenhando um papel fundamental na gravidade e taxas elevadas de mortalidade de COVID-19 (HU *et al.*, 2022).

Finalmente, vale ressaltar a relevância da IL-6 na doença. A citocina estimula a produção de TNF- α e IL-8 que participam na diferenciação de células T auxiliares foliculares, inibe o comprometimento de linfócitos Th1 e atua na diferenciação de linfócitos Th2 regulando a circulação de IL-4 e INF- γ (AHMADPOOR; ROSTAING, 2020). Ainda, níveis elevados de IL-6 levam à lesão pulmonar aguda e suprimem as funções de linfócitos T, macrófagos e células dendríticas, prejudicando resposta imunológica adequada (ZHANG *et al.*, 2004).

Concluindo, ficou demonstrado que a COVID-19 grave é acompanhada por uma “tempestade de citocinas” que desencadeia a SDRA. A falha da resposta imunológica no período inicial da infecção por SARS-CoV-2 induz à hiperinflamação generalizada no pulmão que leva à lesão pulmonar aguda e SDRA (XU Z. *et al.*, 2021; ZHOU Y *et al.*, 2020).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar as concentrações séricas das citocinas associadas à resposta Th17 em pacientes com SARS-CoV-2 grave e associar com a mortalidade.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.1.1.** Quantificar a concentração de citocinas séricas IL-1 β , TGF- β , IL-6, IL-17 e IL-23.
- 1.1.2.** Correlacionar a concentração das citocinas entre si.
- 1.1.3.** Avaliar a associação dos dados clínico-demográficas dos pacientes com o desfecho clínico.
- 1.1.4.** Avaliar a associação dos parâmetros laboratoriais com o desfecho clínico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do estudo e seleção de pacientes

Incluíram-se, prospectivamente, 56 pacientes com COVID-19 admitidos à Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Geral de Vitória da Conquista (HGVC) - Bahia, Brasil. O HGVC é um centro médico de referência situado na terceira maior cidade do estado da Bahia. É conhecido por seus extensos serviços de ensino multidisciplinar e pelo atendimento de um grande volume de casos altamente complexos originários de mais de 70 municípios vizinhos.

No período de estudo, de julho de 2020 a agosto de 2021, todos os pacientes incluídos tiveram a confirmação de infecção pelo SARS-CoV-2 por meio de análise de PCR em tempo real de espécimes de swab nasofaríngeo. Os critérios de internação na UTI incluíram a necessidade de oxigênio igual ou superior a 5 l/min para atingir uma saturação de oxigênio periférica de 90-92%, insuficiência respiratória, choque, disfunção orgânica aguda e pacientes apresentando uma susceptibilidade aumentada à deterioração clínica.

O estudo foi conduzido estritamente em conformidade com as diretrizes éticas delineadas na Declaração de Helsinque, e a aprovação ética foi obtida da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) (Parecer nº 4.155.234). O termo de consentimento foi obtido dos representantes legais responsáveis pelos pacientes incluídos.

Obtenção de dados clínico-demográficos

Informações clínicas e demográficas relevantes dos pacientes foram extraídas dos registros médicos dos pacientes internados no CTI. Os dados obtidos incluíram sexo, idade, frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura, saturação de oxigênio, contagem de leucócitos, contagem de plaquetas, níveis de hemoglobina, níveis de proteína C-reativa (PCR) e quaisquer comorbidades associadas. Os desfechos clínicos foram monitorados cuidadosamente por meio do sistema de internação, que documentou detalhes relevantes, como alta, transferência ou óbito.

Amostragem de plasma

Amostras de sangue foram obtidas de todos os pacientes imediatamente depois da admissão à UTI. Cinco ml de sangue mantidos em tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e imediatamente centrifugados a 2000g por 10 minutos a 4°C para a obtenção do plasma. As amostras de plasma foram divididas em tubos criogênicos e armazenadas a -80°C até a análise.

Análise de Citocinas no Plasma

Utilizaram-se ensaios imunoenzimáticos (ELISA) com sensibilidades analíticas específicas para as seguintes citocinas: IL-1 β humana (0,3 pg/mL), IL-6 (4,0 pg/mL), IL-17 (2

pg/mL), IL-23 (0,3 pg/mL) e TGF- β (8,6 pg/mL), de acordo com as recomendações do fabricante (Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA)). As amostras descongeladas a baixa temperatura foram submetidas à centrifugação. O sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga e diluído adequadamente para análises subsequentes. A quantificação das citocinas no plasma foi feita de acordo com as orientações do fabricante. As leituras de absorbância foram obtidas por meio do leitor de microplacas DR-200BS-NM (Wuxi Hiwell-Diatek Instruments Co., Ltd., CHINA).

Análise estatística **REVER TUDO**

Os resultados foram avaliados. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada com o teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variância foi verificada por meio do teste de Levene. Além disso, o teste t de Student foi utilizado para comparações de médias. Para aumentar a confiabilidade dos resultados e lidar com desvios da normalidade na distribuição da amostra, bem como variações nos tamanhos dos grupos, procedimentos de *bootstrapping* (1000 reamostragens; IC BCa de 95% foram aplicados. Realizou-se, testes qui-quadrado de independência (2x2) para investigar as associações entre variáveis categóricas. Utilizou-se, por fim, o teste de correlação de Spearman para avaliar as relações entre as citocinas e o desfecho clínico dos pacientes; bem como destas entre si. Optou-se pela exclusão de casos omissos *via* método *listwise*.

5 REFERÊNCIAS

AHMADPOOR, P.; ROSTAING, L. Why the immune system fails to mount an adaptive immune response to a COVID-19 infection. **Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 824–825, july. 2020.

ALEEBRAHIM-DEHKORDI, E. et al. T helper type (Th1/Th2) responses to SARS-CoV-2 and influenza A (H1N1) virus: From cytokines produced to immune responses. **Transplant Immunology**, [s. l.], v. 70, p. 101495, feb. 2022.

BENUCCI, M. et al. COVID-19 pneumonia treated with Sarilumab: A clinical series of eight patients. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 92, n. 11, p. 2368–2370, nov. 2020.

BERGANTINI, L. et al. Cytokine profiles in the detection of severe lung involvement in hospitalized patients with COVID-19: The IL-8/IL-32 axis. **Cytokine**, [s. l.], v. 151, p. 155804, mar. 2022.

BORDONI, V. et al. An Inflammatory Profile Correlates With Decreased Frequency of Cytotoxic Cells in Coronavirus Disease 2019. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 71, n. 16, p. 2272–2275, nov. 2020.

CATANZARO, M. et al. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 84, may. 2020.

CAUCHOIS, R. et al. Early IL-1 receptor blockade in severe inflammatory respiratory failure complicating COVID-19. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 117, n. 32, p. 18951–18953, aug. 2020.

CAVALLI, G. et al. Interleukin-1 blockade with high-dose anakinra in patients with COVID-19, acute respiratory distress syndrome, and hyperinflammation: a retrospective cohort study. **The Lancet. Rheumatology**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. e325–e331, june. 2020.

CHEN, X. et al. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 71, n. 8, p. 1937–1942, nov. 2020.

CHI, Y. et al. Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus Disease 2019 in China. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 222, n. 5, p. 746–754, aug. 2020.

DE BIASI, S. et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 3434, july. 2020.

DEL VALLE, D. M. et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 1636–1643, oct. 2020.

DIMOPOULOS, G. et al. Favorable Anakinra Responses in Severe Covid-19 Patients with Secondary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 117- 123.e1, july. 2020.

DU, R.-H. et al. Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. **The European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 2000524, may. 2020.

DUDLEY, J. P.; LEE, N. T. Disparities in Age-specific Morbidity and Mortality From SARS-CoV-2 in China and the Republic of Korea. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 71, n. 15, p. 863–865, july. 2020.

FARA, A. et al. Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines. **Open Biology**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 200160, sept. 2020.

- FRISCHBUTTER, S. et al. Serum TGF- β as a predictive biomarker for severe disease and fatality of COVID-19. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 53, n. 10, p. e2350433, oct. 2023.
- GIL-ETAYO, F. J. et al. T-Helper Cell Subset Response Is a Determining Factor in COVID-19 Progression. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 624483, 2021.
- GONG, J. et al. A Tool for Early Prediction of Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Multicenter Study Using the Risk Nomogram in Wuhan and Guangdong, China. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 71, n. 15, p. 833–840, july. 2020.
- GRIFONI, A. et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. **Cell**, [s. l.], v. 181, n. 7, p. 1489- 1501.e15, june. 2020.
- GRITTI, G. et al. Siltuximab downregulates interleukin-8 and pentraxin 3 to improve ventilatory status and survival in severe COVID-19. **Leukemia**, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 2710–2714, sept. 2021.
- GUPTA, S. et al. Association Between Early Treatment With Tocilizumab and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19. **JAMA internal medicine**, [s. l.], v. 181, n. 1, p. 41–51, jan. 2021.
- HOEPEL, W. et al. High titers and low fucosylation of early human anti-SARS-CoV-2 IgG promote inflammation by alveolar macrophages. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 596, p. eabf8654, june. 2021.
- HOJYO, S. et al. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. **Inflammation and Regeneration**, [s. l.], v. 40, p. 37, 2020.
- HU, C. et al. Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. **JAMA**, [s. l.], v. 319, n. 23, p. 2401–2409, june. 2018.
- HU, H. et al. Increased Circulating Cytokines Have a Role in COVID-19 Severity and Death With a More Pronounced Effect in Males: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 13, p. 802228, 2022.
- HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10223, p. 497–506, feb. 2020.
- IVANOV, I. I. et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, [s. l.], v. 126, n. 6, p. 1121–1133, sept. 2006.
- LI, H. et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. **Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10235, p. 1517–1520, may. 2020.
- LI, L.-Q. et al. COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 92, n. 6, p. 577–583, june. 2020.

- LIU, T. et al. The role of interleukin-6 in monitoring severe case of coronavirus disease 2019. **EMBO molecular medicine**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. e12421, july. 2020.
- MA, A. et al. Anti-inflammatory effects of oxymatrine on rheumatoid arthritis in rats via regulating the imbalance between Treg and Th17 cells. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 3615–3622, june. 2017.
- MANEL, N.; UNUTMAZ, D.; LITTMAN, D. R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 641–649, june. 2008.
- MANIK, M.; SINGH, R. K. Role of toll-like receptors in modulation of cytokine storm signaling in SARS-CoV-2-induced COVID-19. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 869–877, mar. 2022.
- MARTONIK, D. et al. The Role of Th17 Response in COVID-19. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1550, june. 2021.
- MCGONAGLE, D. et al. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. **Autoimmunity Reviews**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 102537, june. 2020.
- MITTAL, A. et al. COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. e1008762, aug. 2020.
- MONTAZERSAHEB, S. et al. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. **Virology Journal**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 92, may. 2022.
- NASROLLAHI, H. et al. Immune responses in mildly versus critically ill COVID-19 patients. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 14, p. 1077236, 2023.
- NEWTON, A. H.; CARDANI, A.; BRACIALE, T. J. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. **Seminars in Immunopathology**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 471–482, july. 2016.
- NOACK, M.; MIOSSEC, P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. **Autoimmunity Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 668–677, june. 2014.
- PARACKOVA, Z. et al. Neutrophils mediate Th17 promotion in COVID-19 patients. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 109, n. 1, p. 73–76, jan. 2021.
- PROMPETCHARA, E.; KETLOY, C.; PALAGA, T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 1–9, mar. 2020.
- QIN, C. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 71, n. 15, p. 762–768, july. 2020.

- QU, L. et al. ACE2 and Innate Immunity in the Regulation of SARS-CoV-2-Induced Acute Lung Injury: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 21, p. 11483, oct. 2021.
- SÁNCHEZ-DÍEZ, S. et al. Biomarker Profiles Associated with COVID-19 Severity and Mortality. **Current Issues in Molecular Biology**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 1998–2012, mar. 2023.
- SCHULTHEISS, C. et al. Next-Generation Sequencing of T and B Cell Receptor Repertoires from COVID-19 Patients Showed Signatures Associated with Severity of Disease. **Immunity**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 442- 455.e4, aug. 2020.
- SMAIL, S. W. et al. Serum IL-23, IL-10, and TNF- α predict in-hospital mortality in COVID-19 patients. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 14, p. 1145840, 2023.
- TANG, Y. et al. Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, p. 1708, 2020.
- TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews. Immunology**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 363–374, june. 2020.
- TOH, M.-L. et al. IL-17 inhibits human Th1 differentiation through IL-12R beta 2 downregulation. **Cytokine**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 226–230, dec. 2009.
- WAN, S. et al. Relationships among lymphocyte subsets, cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 189, n. 3, p. 428–437, may. 2020.
- WANG, Y.-H.; LIU, Y.-J. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 697–702, dec. 2008.
- WITKOWSKI, M. et al. Untimely TGF β responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. **Nature**, [s. l.], v. 600, n. 7888, p. 295–301, dec. 2021.
- YE, Q.; WANG, B.; MAO, J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. **The Journal of Infection**, [s. l.], v. 80, n. 6, p. 607–613, june. 2020.
- ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, mar. 2020.

6 PRODUTO CIENTÍFICO

6.1 Artigo único

Association between elevated cytokine concentrations associated with the Th17 response and poor outcomes in COVID-19 patients admitted to the Intensive Care Unit (ICU): a prospective study

Luana Weber Lopes¹, Fabian Felliipe Bueno Lemos¹, Marcel Silva Luz¹, Luís Guilherme de Oliveira Silva, Dulciene Maria de Magalhães Queiroz², Fabrício Freire de Melo¹

¹ Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia.

² Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

ABSTRACT

COVID-19 is an infectious disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). It is now understood that the immune response plays a crucial role in modulating the severity and outcome of this disease. In this context, the Th17 response has been receiving increasing attention due to its ability to modulate inflammation. A prospective inclusion of 56 COVID-19 patients admitted to the Intensive Care Unit (ICU) of the General Hospital of Vitória da Conquista (HGVC) in Bahia, Brazil, was conducted. All included patients had SARS-CoV-2 infection confirmed through real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) of nasopharyngeal swab samples. Serum samples were collected from all participants to determine the concentration of Th17-associated cytokines (IL-1 β , TGF- β , IL-6, IL-17, and IL-23) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The Shapiro-Wilk test assessed the normality of data distribution, and Levene's test verified variance homogeneity. Student's t-test was employed for mean comparisons, and chi-square independence tests (2x2) examined associations between categorical variables. Lastly, Spearman correlation evaluated associations between cytokines and the mortality outcome variable. It was initially demonstrated that male patients had a higher likelihood of mortality compared to female patients. Deceased patients exhibited higher levels of IL-1 β and IL-6 compared to those discharged, while TGF- β levels in deceased patients were substantially elevated. Although statistically significant differences were not observed, there was a trend of higher levels of IL-17 and IL-23 in patients who succumbed to mortality. IL-1 β and TGF- β showed a significant strong correlation with the mortality outcome, while IL-6 presented a moderate correlation. Strong significant correlations were found between IL-1 β and TGF- β , as well as between IL-6 and IL-17, and IL-6 and IL-23, with a moderate correlation observed between IL-6 and TGF- β . Finally, IL-17 and IL-23 exhibited a significant correlation with each other. Based on our analysis, we conclude that elevated levels of cytokines IL-1 β , TGF- β , and IL-6 are significantly associated with an unfavorable outcome in SARS-CoV-2 patients, irrespective of comorbidities. These cytokines may play a crucial role in the pathogenesis of the disease and serve as useful indicators for assessing the severity and prognosis of SARS-CoV-2-infected patients.

Keywords: SARS-CoV-2. Cytokines. Response Th17.

INTRODUCTION

COVID-19, the disease caused by the SARS-CoV-2 virus (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), has spread on a pandemic scale since the first reported case in Wuhan, China, in 2019¹. SARS-CoV-2 is a betacoronavirus, consisting of a non-segmented, enveloped

virus with a diameter ranging from 60 to 140 nm². Its genome is composed of single-stranded RNA, which shares phylogenetic similarity with the severe acute respiratory syndrome coronavirus 1 (SARS-CoV-1), which caused an outbreak in 2003.

The majority of COVID-19 patients (81%) experience milder symptoms and recover without supportive treatment. Around 14% of patients develop severe respiratory distress, while approximately 5% are classified as critical cases due to rapidly progressing respiratory failure requiring ventilatory support and specialized treatment in Intensive Care Units^{3,4}.

Severe COVID-19 can trigger an excessive immune response, characterized by massive production of inflammatory cytokines and chemical mediators, known as a cytokine storm⁵⁻⁷. This cytokine storm, an uncontrolled systemic inflammatory response primarily mediated by the innate immune system, causes severe immunological damage to the patient^{8,9}. Elevated cytokine levels during the systemic inflammatory response syndrome can lead to multiple organ failure. Severe patients typically present high neutrophil counts and low lymphocyte numbers¹⁰.

Recent studies have reported a relationship between serum levels of inflammatory cytokines and the severity or prognosis of COVID-19 patients^{11,12}. Considerably elevated quantities of cytokines IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-17, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), and tumor necrosis factor (TNF) have been reported in hospitalized severe patients¹³⁻²².

The human immune system is divided into innate and adaptive immunity. Although both responses are interconnected and play a joint role, each has specialized cells and different functions. Adaptive immunity consists of B cells, which produce antibodies, CD4+ T cells that orchestrate the immune response by producing cytokines and providing help to other immune cells, and CD8+ T cells with cytotoxic potential^{23,24}.

Low activation of Th1 cells has been observed to be associated with a poor prognosis of the disease, and a lower percentage of Th1 cells is observed in severe COVID-19 patients compared to mild patients^{25,26}. Previous studies have suggested that compared to mild COVID-19, the increased expansion of peripheral neutrophils in severe COVID-19 potentially suppresses Th1 cell differentiation and triggers Th17 cell polarization²⁷.

Increasing evidence suggests that Th17 cells play an important role in the pathogenesis of COVID-19, not only activating the cytokine cascade but also inducing Th2 responses,

inhibiting Th1 differentiation, and suppressing Treg cells^{13,28,29}. Thus, we evaluated the possible association of cytokines involved in Th17 cell differentiation (IL-1 β , TGF- β , IL-6, IL-17, and IL-23) with the disease course and the potential outcome of COVID-19 patients.

PATIENTS AND METHODS

Study design and patient selection

We prospectively included 56 patients with COVID-19 admitted to the Intensive Care Unit (ICU) of the General Hospital of Vitória da Conquista (HGVC) – Bahia, Brazil. HGVC is a renowned medical center situated in the third largest city in the state of Bahia. It is known for its extensive multidisciplinary teaching services and handles a large volume of highly complex cases originating from over 70 neighboring municipalities. The study period spanned from July 2020 to August 2021. All study patients had confirmation of SARS-CoV-2 infection through real-time PCR analysis of nasopharyngeal swab specimens. ICU admission criteria included the need for oxygen equal to or greater than 5 L/min to achieve peripheral oxygen saturation of 90-92%, respiratory failure, shock, acute organ dysfunction, and patients presenting an increased susceptibility to clinical deterioration.

The study was conducted strictly in accordance with the ethical guidelines outlined in the Declaration of Helsinki, and ethical approval was obtained from the National Research Ethics Commission (CONEP) (no. 4.155.234). Informed consent was obtained from the legal representatives responsible for the included patients

Clinical and demographic data collection

Following admission to the ICU, relevant clinical and demographic information of the patients was extracted from medical records. The extracted data included gender, age, respiratory rate, heart rate, temperature, oxygen saturation, white blood cell count, platelet count, hemoglobin levels, C-reactive protein (CRP) levels, and any associated comorbidities. Clinical outcomes were carefully monitored through the hospitalization system, which documented relevant details such as discharge, transfer, or death.

Plasma sampling

Blood samples were collected from all patients immediately after admission to the ICU. Five mL of blood were collected in pre-loaded tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

and immediately centrifuged at 2000g for 10 minutes at 4°C to separate the plasma. Plasma samples were aliquoted into cryogenic tubes and stored at -80°C until analysis.

Plasma cytokine analysis

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) with specific analytical sensitivities for the following cytokines were utilized: human IL-1 β (0.3 pg/mL), IL-6 (4.0 pg/mL), IL-17 (2 pg/mL), IL-23 (0.3 pg/mL), and TGF- β (8.6 pg/mL), following the manufacturer's recommendations (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Samples were thawed at low temperature and subjected to centrifugation at 1000g for 10 minutes to remove particles and sediment. The resulting supernatant plasma was transferred to clean microcentrifuge tubes and appropriately diluted for subsequent analyses. Cytokine quantification in plasma was strictly conducted according to the manufacturer's guidelines for each ELISA kit. Absorbance readings were obtained using the DR-200BS-NM microplate reader (Wuxi Hiwell-Diatek Instruments Co., Ltd., CHINA).

Statistical analysis

Normality of data distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test, and variance homogeneity was checked through the Levene's test. Additionally, Student's t-test was used for mean comparisons. To enhance result reliability and address deviations from normality in sample distribution as well as variations in group sizes, bootstrapping procedures (1000 resamplings; 95% BCa confidence intervals) were applied. Chi-square tests of independence (2x2) were conducted to investigate associations between categorical variables. Finally, Spearman's correlation test was employed to assess relationships between cytokines and patients' clinical outcomes, as well as among cytokines themselves. Exclusion of missing cases was performed via listwise deletion method.

RESULTS

Clinical and demographic characteristics of patients

This study included 56 patients with a mean age of 64.52 years (15 - 97 years). Gender distribution revealed that 42 patients (58.3%) were female, while 30 patients (41.7%) were male. Regarding age, 29 patients (40.3%) belonged to the group under 65 years old, and 43 patients (59.7%) to the group aged 65 years or older. As for outcomes, 34 patients (61.8%) were discharged, while 21 patients (38.2%) deceased. Regarding comorbidities, 12 patients (78.6%)

did not have any comorbidities, while 44 patients (21.4%) had documented comorbidities (Table 1).

Table 1. Demographic characteristics of the included patients (n = 56).

	<i>n</i>	%
Gender		
Female	42	58.3
Male	30	41.7
Age		
<65	29	40.3
≥65	43	59.7
Outcome		
Discharge	34	61.8
Death	21	38.2
Comorbidities		
Not afflicted	12	78.6
Afflicted	44	21.4

Chi-square tests of independence (2x2) were conducted to investigate whether there was an association between age (<65 and ≥65), gender (female and male), comorbidities (unaffected and affected), and the clinical outcome of patients (discharge and deceased). A significant association was found between the outcome and gender [$\chi^2(1) = 4.14, p < 0.05; \phi = .272$]. Odds ratio analyses demonstrated that male patients had 3.39 times higher odds of death compared to female patients (Table 2). On the other hand, no association was observed between age and comorbidities variables and the clinical outcome.

Additionally, a Student's t-test was conducted to identify the extent to which the age variable could differ between the group of patients discharged and the group that deceased. To enhance result reliability and address deviations from normality in sample distribution as well as variations in group sizes, bootstrapping procedures (1000 resamplings; 95% BCa confidence intervals) were applied. Consequently, it was demonstrated that there were no statistically significant differences in age between patients discharged (M = 63.60; SD = 17.39) and those deceased (M = 66.05; SD = 15.59) ($t(54) = -.530, p = .60$).

Table 2. Bivariate descriptive statistics (n = 56).

Death		Discharge		$\chi^2(df)$	ϕ	<i>p</i> -value	Odds Ratio
<i>n</i>	%	<i>N</i>	%				

Age									
<65	16	28.6	8	14.3					
≥65	19	33.9	13	23.2	.31 (1)	-	.353	-	
Gender									
Female	18	32.1	5	8.9					
Male	17	30.4	16	28.6	4.137 (1)	.272	< .05	3.39	
Comorbidities									
Not afflicted	5	8.9	5	8.9					
Afflicted	27	48.2	14	25.0	.864 (1)	-	.577	-	

n number of patients, χ^2 chi-square, (*df*) degrees of freedom, ϕ phi.

Comparative analysis of laboratory parameters

Student's t-tests were conducted to identify the extent to which laboratory parameters could differ between the outcome groups. To enhance result reliability and address deviations from normality in sample distribution as well as variations in group sizes, bootstrapping procedures (1000 resamplings; 95% BCa confidence intervals) were applied.

In this regard, no significant differences were observed between groups. However, the mean differences between groups in the white blood cell count (/mm³) and plasma concentrations of C-reactive protein [CRP (mg/dL)], although not significant, exhibited moderate effect sizes (respectively: Hedge's *G* = .59 and Hedges' *G* = .46) (Table 3).

Table 3. Laboratory parameters of included patients (*n* = 35).

	Discharge		Death		<i>MD</i>	CI 95% <i>MD</i>		<i>t</i> (54)	<i>p</i> - value	Hedge's <i>G</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>		Lower	Upper			
Hb (g/dL)	11.51	3.02	11.96	2.71	-.46	-2.08	1.21	-.418	.66	.15

Leukocytes /mm ³	14,605.15	8,445.02	28,615.60	43,282.8	-14,010.45	-49,359.31	4339.75	-1.018	.49	.59
Platelets (mg/dL)	210,776.63	110,050.48	163,926	61,858.87	46,850.63	-18,887.92	114,123.09	1.267	.13	.05
RCP (mg/dL)	154.39	157.34	147.34	133.72	7.05	-100.35	97.85	.125	.90	.46

M mean, *SD* standard deviation, *MD* mean difference, *CI* confidence intervals.

Comparative analysis of cytokine levels by outcome

Student's t-tests were conducted to identify the extent to which plasma cytokine concentrations (i.e., IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-23, and TGF- β) could differ between the group of patients discharged and the group that deceased. To enhance result reliability and address deviations from normality in sample distribution as well as variations in group sizes, bootstrapping procedures (1000 resamplings; 95% BCa confidence intervals) were applied.

A statistically significant difference was observed in IL-1 β levels between the two groups ($t(54) = -26.71$, $p < .001$), indicating that deceased patients had considerably higher levels compared to discharged patients ($M = 564.10$, $SD = 110.81$ pg/mL versus $M = 249.51$, $SD = 49.16$ pg/mL, respectively). Similarly, IL-6 levels were significantly higher in the deceased group compared to the discharged group ($M = 709.76$, $SD = 191.28$ pg/mL versus $M = 600.29$, $SD = 207.78$ pg/mL, respectively), with a mean difference of -109.48 pg/mL ($t(54) = -8.08$, $p < .05$) (Table 2; Figure 3).

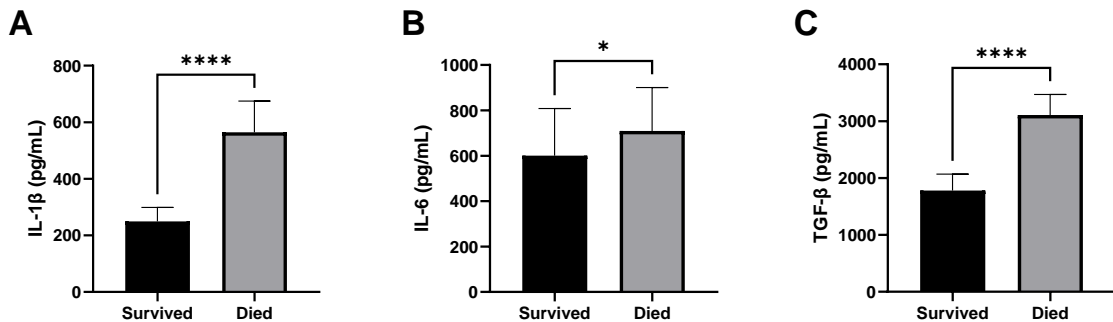
Regarding IL-17 and IL-23 markers, although no statistically significant differences were observed between the discharged and deceased groups (IL-17: $t(54) = 13.80$, $p = .083$; IL-23: $t(54) = 43.52$, $p = .122$), a trend of higher levels of these cytokines in the deceased group compared to the discharged group was noted (Table 2).

Lastly, TGF- β levels showed a highly significant difference between the groups ($t(54) = -15.14$, $p < .001$), indicating that deceased patients had substantially higher levels than those discharged ($M = 3108.52$, $SD = 360.18$ pg/mL versus $M = 1778.69$, $SD = 290.58$ pg/mL, respectively) (Table 4; Figure 1).

Table 4. Differences in mean plasma concentrations of cytokines between groups (n = 56).

	Discharge		Death		<i>MD</i>	CI 95% <i>MD</i>		<i>t</i> (54)	<i>p-value</i>	Hedge's <i>G</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>		Lower	Upper			
IL-1 β	249.51	49.16	564.10	110.81	-314.58	-372.59	-26.71	12.31	<.001	4.07
IL-6	600.29	207.78	709.76	191.28	-109.48	-212.66	-8.08	1.97	<.05	.55
IL-17	433.31	217.49	514.10	137.79	-80.78	-169.15	13.80	1.53	.083	.42
IL-23	793.40	324.48	926.76	337.34	-133.36	-325.30	43.52	1.50	.122	.41
TGF- β	1778.6	290.58	3108.5	360.18	-	-	-	-	-	-
	9		2		1329.8	1541,04	1133,81	15.14	<.001	4.21
					4					

M mean, *SD* standard deviation, *MD* mean differences, CI confidence interval.

Figure 1. Differences in mean plasma concentrations of cytokines between groups (n = 56)

Correlation of specific cytokines with COVID-19-related mortality and association between cytokines

Spearman's correlation test was utilized to assess the relationship between cytokines and the clinical outcome of patients. Cases with missing data were excluded using the listwise method. IL-1 β and TGF- β revealed a significant correlation of strong magnitude with the outcome ($r = .839$, $p < .01$), while IL-6 showed a significant correlation ($r = .305$, $p < .05$). Conversely, (Figure 2). Significantly correlation between IL-17 Subsequently, correlations between

cytokines were investigated. IL-1 β exhibited a significant strong correlation with TGF- β ($r = .776$, $p < .01$). Additionally, IL-6 also showed a significant strong correlation with IL-17 ($r = .884$, $p < .01$) and IL-23 ($r = .886$, $p < .01$), as well as a moderate correlation with TGF- β ($r = .307$, $p < .05$). Finally, IL-17 and IL-23 displayed a significant correlation between themselves ($r = .819$, $p < .01$) (Figure 3).

Figure 2. Spearman's correlation was used to evaluate the correlation of specific cytokines with the outcome ($n = 56$).

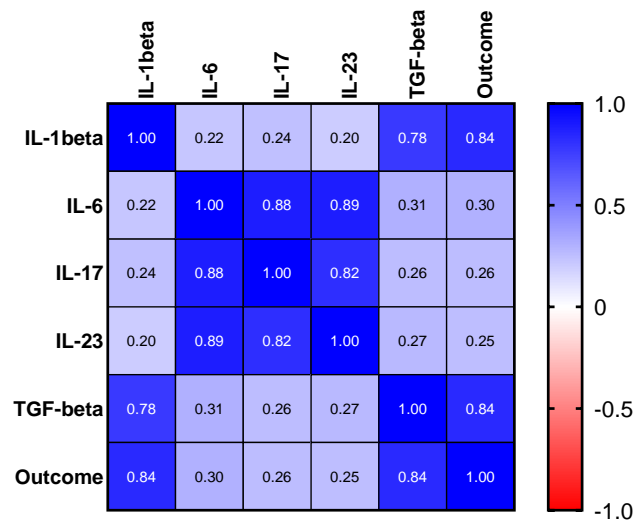
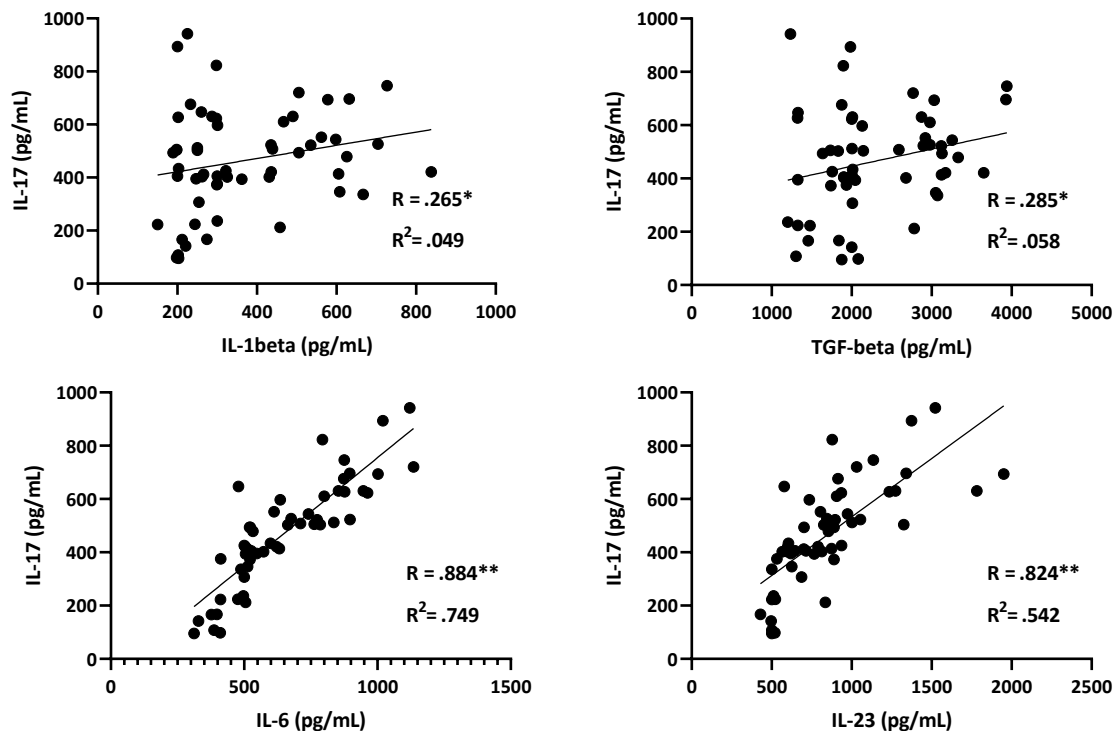


Figure 3. Spearman's correlation was used to correlate IL-17 with cytokines related to the Th17 response. ($n = 56$)



DISCUSSION

This study investigated the association of cytokines involved in the Th17 response with an unfavorable outcome in patients hospitalized in an ICU of a Brazilian public hospital. A strong association of IL-1 β with mortality outcome was observed in the studied patients. To our knowledge, this is the only study to have correlated IL-1 β with mortality outcome, although some authors have reported elevated serum levels of IL-1 β in severe cases^{1(p20232023),30,31}.

Given the increase in IL-1 β during the cytokine storm, agents targeting IL-1 β signaling have been introduced in clinical trials for COVID-19 treatment, including Anakinra, which is a recombinant IL-1 receptor antagonist that blocks IL-1 α and IL-1 β signaling pathways, potentially having beneficial effects in alleviating hyperinflammation in severe COVID-19 cases^{32–36}. The use of anakinra improved systemic inflammation and respiratory complications in 29 COVID-19 patients with ARDS compared to standard treatment³⁷.

Our cytokine profile revealed a moderate association of IL-6 with mortality outcome, consistent with findings in the literature which identify IL-6 as a key inflammatory driver in the pathogenesis of SARS-CoV-2. This highlights IL-6 as a marker for severity and survival in COVID-19^{10,38–40}.

IL-6 has been at the center of the cytokine storm associated with COVID-19. Several studies have linked elevated serum levels of IL-6 to the development of more severe disease, presenting this cytokine as a predictor of worse prognosis. Del Valle *et al.* concluded that high serum levels of IL-6 at the time of hospitalization were strong and independent predictors of patient mortality³⁸. Prompetchara *et al.* identified a 52% increase in IL-6 levels in ICU patients compared to non-ICU patients⁴¹.

After assessing the significant increase in IL-6 levels in severely ill patients, several studies have evaluated the use of monoclonal antibodies targeting IL-6 and its receptor (IL-6R). These studies have shown that treatment with these antibodies reduced mortality among critically ill patients admitted to the ICU when administered immediately upon ICU admission compared to those who did not receive it^{42,43}. Additionally, they have been found to reduce the need for respiratory support, serum PCR levels, and clinical outcomes in severe or critical COVID-19 cases⁴³⁻⁴⁵.

Targeting IL-6 and IL-1 β may be effective in treating the inflammatory cytokine storm during disease progression.

TGF- β emerged as a significant predictor of mortality in the present study, a finding supported by Frischbutter *et al.*⁴⁶, who associated elevated serum levels of TGF- β during the first two weeks after symptom onset with progression to severe COVID-19 requiring ICU care. Furthermore, early serum elevation of TGF- β was deemed a hallmark of severe COVID-19⁴⁷.

Unlike IL-17 produced by the Th17 cell population, TGF- β is a cytokine that plays multiple regulatory roles in the immune system. This cytokine is unable to initiate Th17 cell differentiation as it possesses opposing modulatory effects on the inflammatory process. It is necessary for pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-21 to be present in the tissue⁴⁸. Thus, in the presence of IL-6 and TGF- β , CD4⁺ T lymphocytes differentiate into Th17 cells⁴⁹. This highlights that our observations indicate a pattern of increased cytokines related to the Th17 cell response.

In our study, statistically significant correlations were not found between IL-17 and IL-23 and the outcome of mortality. However, we found IL-1 β , IL-6, and TGF- β to have statistically significant correlations with this outcome. These cytokines are essential in Th17 differentiation, as in the presence of cytokines such as IL-6 and TGF- β in inflamed tissue, ROR γ t activation induces the differentiation of T lymphocytes into Th17 lymphocytes⁵⁰. IL-

1 β , IL-6, and IL-23 are important mediators with amplification and stabilization action on Th17 cells for the maintenance of IL-17 and IL-22 production^{49,51}.

In seeking explanations for these findings, the hypothesis was raised that we may have worked with severely ill patients admitted to the ICU without allowing time to observe an increase in cytokine release, such as IL-17 and IL-23 leading these patients to death.

Although IL-17 is not directly correlated with mortality, its significant associations with other cytokines, including those associated with death, suggest the involvement of the Th17 response in the unfavorable outcomes of COVID-19.

We did not find a significant association between IL-17 and death, as demonstrated in a study conducted in China, which showed no difference in IL-17 levels between severe and mild patients⁵². In contrast, another study conducted in China showed higher serum levels of IL-17 in severe cases⁵³. We did not identify studies correlating IL-17 concentration with mortality.

IL-23 was not significantly associated with death in the present study, in contrast to a previous study that associated elevated IL-23 levels with more critical cases, with this increase being linked to in-hospital mortality³.

Our findings demonstrate that male patients have a 3.39 times higher chance of dying compared to female patients. Similarly, other studies in the literature report that COVID-19 exhibits differences in severity and mortality according to gender^{40,54-56}.

Regarding the Th17 response, it has been observed that changes in cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TGF- β are associated with the severity and mortality of patients with COVID-19, making them potential prognostic markers and therapeutic targets. Early in the disease course, a prediction model based on cytokine levels may help guide early intervention, thereby avoiding potential adverse effects.

REFERENCES

1. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
2. Mittal A, Manjunath K, Ranjan RK, Kaushik S, Kumar S, Verma V. COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. *PLoS Pathog*. 2020;16(8):e1008762. doi:10.1371/journal.ppat.1008762
3. Smail SW, Babaei E, Amin K, Abdulahad WH. Serum IL-23, IL-10, and TNF- α predict in-hospital mortality in COVID-19 patients. *Front Immunol*. 2023;14:1145840. doi:10.3389/fimmu.2023.1145840
4. Hu Y, Sun J, Dai Z, et al. Prevalence and severity of corona virus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol*. 2020;127:104371. doi:10.1016/j.jcv.2020.104371
5. Manik M, Singh RK. Role of toll-like receptors in modulation of cytokine storm signaling in SARS-CoV-2-induced COVID-19. *J Med Virol*. 2022;94(3):869-877. doi:10.1002/jmv.27405
6. Qu L, Chen C, Yin T, et al. ACE2 and Innate Immunity in the Regulation of SARS-CoV-2-Induced Acute Lung Injury: A Review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11483. doi:10.3390/ijms222111483
7. Bergantini L, d'Alessandro M, Cameli P, et al. Cytokine profiles in the detection of severe lung involvement in hospitalized patients with COVID-19: The IL-8/IL-32 axis. *Cytokine*. 2022;151:155804. doi:10.1016/j.cyto.2022.155804
8. McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun Rev*. 2020;19(6):102537. doi:10.1016/j.autrev.2020.102537
9. Ahmadpoor P, Rostaing L. Why the immune system fails to mount an adaptive immune response to a COVID-19 infection. *Transpl Int*. 2020;33(7):824-825. doi:10.1111/tri.13611
10. Qin C, Zhou L, Hu Z, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):762-768. doi:10.1093/cid/ciaa248
11. Gong J, Ou J, Qiu X, et al. A Tool to Early Predict Severe Corona Virus Disease 2019 (COVID-19): A Multicenter Study using the Risk Nomogram in Wuhan and Guangdong, China. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. doi:10.1093/cid/ciaa443
12. Liu T, Zhang J, Yang Y, et al. The role of interleukin-6 in monitoring severe case of coronavirus disease 2019. *EMBO Mol Med*. 2020;12(7):e12421. doi:10.15252/emmm.202012421
13. Martonik D, Parfieniuk-Kowerda A, Rogalska M, Flisiak R. The Role of Th17 Response in COVID-19. *Cells*. 2021;10(6):1550. doi:10.3390/cells10061550

14. Catanzaro M, Fagiani F, Racchi M, Corsini E, Govoni S, Lanni C. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):84. doi:10.1038/s41392-020-0191-1
15. Tang Y, Liu J, Zhang D, Xu Z, Ji J, Wen C. Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. *Front Immunol.* 2020;11:1708. doi:10.3389/fimmu.2020.01708
16. Hojyo S, Uchida M, Tanaka K, et al. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm Regen.* 2020;40:37. doi:10.1186/s41232-020-00146-3
17. Bordoni V, Sacchi A, Cimini E, et al. An Inflammatory Profile Correlates With Decreased Frequency of Cytotoxic Cells in Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020;71(16):2272-2275. doi:10.1093/cid/ciaa577
18. Li H, Liu L, Zhang D, et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet.* 2020;395(10235):1517-1520. doi:10.1016/S0140-6736(20)30920-X
19. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):363-374. doi:10.1038/s41577-020-0311-8
20. De Biasi S, Meschiari M, Gibellini L, et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun.* 2020;11(1):3434. doi:10.1038/s41467-020-17292-4
21. Schultheiß C, Paschold L, Simnica D, et al. Next-Generation Sequencing of T and B Cell Receptor Repertoires from COVID-19 Patients Showed Signatures Associated with Severity of Disease. *Immunity.* 2020;53(2):442-455.e4. doi:10.1016/j.immuni.2020.06.024
22. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect.* 2020;80(6):607-613. doi:10.1016/j.jinf.2020.03.037
23. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell.* 2020;181(7):1489-1501.e15. doi:10.1016/j.cell.2020.05.015
24. Newton AH, Cardani A, Braciale TJ. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin Immunopathol.* 2016;38(4):471-482. doi:10.1007/s00281-016-0558-0
25. Gil-Etayo FJ, Suárez-Fernández P, Cabrera-Marante O, et al. T-Helper Cell Subset Response Is a Determining Factor in COVID-19 Progression. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:624483. doi:10.3389/fcimb.2021.624483
26. Alebrahim-Dehkordi E, Molavi B, Mokhtari M, et al. T helper type (Th1/Th2) responses to SARS-CoV-2 and influenza A (H1N1) virus: From cytokines produced to immune responses. *Transpl Immunol.* 2022;70:101495. doi:10.1016/j.trim.2021.101495
27. Parackova Z, Bloomfield M, Klocperk A, Sediva A. Neutrophils mediate Th17 promotion in COVID-19 patients. *J Leukoc Biol.* 2021;109(1):73-76. doi:10.1002/JLB.4COVCRA0820-481RRR
28. Toh ML, Kawashima M, Zrioual S, Hot A, Miossec P, Miossec P. IL-17 inhibits human Th1 differentiation through IL-12R beta 2 downregulation. *Cytokine.* 2009;48(3):226-230. doi:10.1016/j.cyto.2009.07.013

29. Wang YH, Liu YJ. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(6):697-702. doi:10.1016/j.coi.2008.09.004
30. Hu H, Pan H, Li R, He K, Zhang H, Liu L. Increased Circulating Cytokines Have a Role in COVID-19 Severity and Death With a More Pronounced Effect in Males: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 2022;13:802228. doi:10.3389/fphar.2022.802228
31. Sánchez-Díez S, Gómez-Ollés C, Cruz MJ, et al. Biomarker Profiles Associated with COVID-19 Severity and Mortality. *Curr Issues Mol Biol*. 2023;45(3):1998-2012. doi:10.3390/cimb45030128
32. Dimopoulos G, de Mast Q, Markou N, et al. Favorable Anakinra Responses in Severe Covid-19 Patients with Secondary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Cell Host Microbe*. 2020;28(1):117-123.e1. doi:10.1016/j.chom.2020.05.007
33. Cauchois R, Koubi M, Delarbre D, et al. Early IL-1 receptor blockade in severe inflammatory respiratory failure complicating COVID-19. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(32):18951-18953. doi:10.1073/pnas.2009017117
34. Nasrollahi H, Talepoor AG, Saleh Z, et al. Immune responses in mildly versus critically ill COVID-19 patients. *Front Immunol*. 2023;14:1077236. doi:10.3389/fimmu.2023.1077236
35. Montazersaheb S, Hosseiniyan Khatibi SM, Hejazi MS, et al. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virol J*. 2022;19(1):92. doi:10.1186/s12985-022-01814-1
36. Fara A, Mitrev Z, Rosalia RA, Assas BM. Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines. *Open Biol*. 2020;10(9):200160. doi:10.1098/rsob.200160
37. Cavalli G, De Luca G, Campochiaro C, et al. Interleukin-1 blockade with high-dose anakinra in patients with COVID-19, acute respiratory distress syndrome, and hyperinflammation: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol*. 2020;2(6):e325-e331. doi:10.1016/S2665-9913(20)30127-2
38. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020;26(10):1636-1643. doi:10.1038/s41591-020-1051-9
39. Chen X, Zhao B, Qu Y, et al. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020;71(8):1937-1942. doi:10.1093/cid/ciaa449
40. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054-1062. doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3
41. Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2020;38(1):1-9. doi:10.12932/AP-200220-0772
42. Gupta S, Wang W, Hayek SS, et al. Association Between Early Treatment With Tocilizumab and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19. *JAMA Intern Med*. 2021;181(1):41-51. doi:10.1001/jamainternmed.2020.6252

43. Gritti G, Raimondi F, Ripamonti D, et al. IL-6 signalling pathway inactivation with siltuximab in patients with COVID-19 respiratory failure: an observational cohort study. Published online June 20, 2020:2020.04.01.20048561. doi:10.1101/2020.04.01.20048561
44. Hoepel W, Chen HJ, Allahverdiyeva S, et al. Anti-SARS-CoV-2 IgG from severely ill COVID-19 patients promotes macrophage hyper-inflammatory responses. Published online July 13, 2020:2020.07.13.190140. doi:10.1101/2020.07.13.190140
45. Benucci M, Giannasi G, Cecchini P, et al. COVID-19 pneumonia treated with Sarilumab: A clinical series of eight patients. *J Med Virol.* 2020;92(11):2368-2370. doi:10.1002/jmv.26062
46. Frischbutter S, Durek P, Witkowski M, et al. Serum TGF- β as a predictive biomarker for severe disease and fatality of COVID-19. *Eur J Immunol.* 2023;53(10):e2350433. doi:10.1002/eji.202350433
47. Witkowski M, Tizian C, Ferreira-Gomes M, et al. Untimely TGF β responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. *Nature.* 2021;600(7888):295-301. doi:10.1038/s41586-021-04142-6
48. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ . *Nat Immunol.* 2008;9(6):641-649. doi:10.1038/ni.1610
49. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2014;13(6):668-677. doi:10.1016/j.autrev.2013.12.004
50. Ma A, Yang Y, Wang Q, Wang Y, Wen J, Zhang Y. Anti-inflammatory effects of oxymatrine on rheumatoid arthritis in rats via regulating the imbalance between Treg and Th17 cells. *Mol Med Rep.* 2017;15(6):3615-3622. doi:10.3892/mmr.2017.6484
51. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 2006;126(6):1121-1133. doi:10.1016/j.cell.2006.07.035
52. Wan S, Yi Q, Fan S, et al. Relationships among lymphocyte subsets, cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients. *Br J Haematol.* 2020;189(3):428-437. doi:10.1111/bjh.16659
53. Chi Y, Ge Y, Wu B, et al. Serum Cytokine and Chemokine Profile in Relation to the Severity of Coronavirus Disease 2019 in China. *J Infect Dis.* 2020;222(5):746-754. doi:10.1093/infdis/jiaa363
54. Dudley JP, Lee NT. Disparities in Age-specific Morbidity and Mortality From SARS-CoV-2 in China and the Republic of Korea. *Clin Infect Dis.* 2020;71(15):863-865. doi:10.1093/cid/ciaa354
55. Li LQ, Huang T, Wang YQ, et al. COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. *J Med Virol.* 2020;92(6):577-583. doi:10.1002/jmv.25757
56. Du RH, Liang LR, Yang CQ, et al. Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. *Eur Respir J.* 2020;55(5):2000524. doi:10.1183/13993003.00524-2020

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, esses achados destacam o envolvimento da resposta Th17 nos desfechos desfavoráveis da COVID-19. Elevados níveis das citocinas IL-1 β , TGF- β e IL-6 correlacionam-se significativamente com resultados adversos em pacientes com SARS-CoV-2 na UTI, podendo ser utilizadas como marcadores prognósticos e alvo terapêutico. No início da doença, um modelo de previsão baseado nos níveis de citocinas pode ajudar a orientar uma intervenção precoce, evitando assim possíveis efeitos secundários.