

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

FRANCISCO JAVIER ROMERO MERCADO

**PREDIÇÃO E ESTUDO DAS INTERAÇÕES DOS HLAS DE CLASSE I E II COM  
AS PROTEÍNAS DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA E DO VÍRUS VACINAL  
CONTRA A FEBRE AMARELA YF-17DD**

Belo Horizonte

2022

Francisco Javier Romero Mercado

**PREDIÇÃO E ESTUDO DAS INTERAÇÕES DOS HLAS DE CLASSE I E II COM  
AS PROTEÍNAS DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA E DO VÍRUS VACINAL  
CONTRA A FEBRE AMARELA YF-17DD**

Dissertação apresentada ao programa de pos-graduacao em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Helton Da Costa Santiago

Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Xavier Lima

Belo Horizonte

2022

043

Mercado, Francisco Javier Romero.

Predição e estudo das interações dos HLAs de classe I e II com as proteínas do vírus da febre amarela e do vírus vacinal contra a febre amarela YF-17DD [manuscrito] / Francisco Javier Romero Mercado. – 2022.

78 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Helton da Costa Santiago Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Xavier Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Vírus da Febre Amarela. 3. Antígenos HLA. 4. Vacinas Virais. I. Santiago, Helton da Costa. II. Lima, Cristiano Xavier. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha  
 31270-901 - Belo Horizonte - MG  
 e-mail: pg\_biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



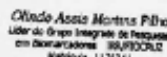
**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FRANCISCO JAVIER ROMERO MERCADO.** Aos vinte e quatro dias do mês de março de 2022 às 14:00 horas, reuniu-se de forma "on line" pela plataforma "Conferência web", no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Predição e estudo das interações dos HLAs de classe I e II com as proteínas do vírus febre amarela e do vírus vacinal contra a febre amarela YF-17DD", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Helton da Costa Santiago, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Olindo Assis Martins Filho (Instituto René Rachou - Fiocruz -MG), aprovado; Dr. Cristiano Xavier Lima - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

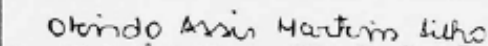
APROVADO  
 REPROVADO


O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 24 de março de 2022.

 liza.felicorivilela

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)

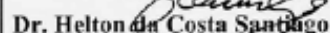
  
 Olindo Assis Martins Filho  
 Líder do Grupo Integrado de Pesquisas  
 em Doenças Raras - IGP/IOCRLZ  
 Matrícula 117041

  
 Dr. Olindo Assis Martins Filho (Instituto René Rachou - Fiocruz -MG)

  
 Dr. Cristiano Xavier Lima - Coorientador (UFMG)



Profª Leda Quercia Vieira  
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia

  
 Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG)

## **Agradecimentos**

Agradeço...

Ao Prof. Dr. Helton Santiago, profissional e pessoa exemplar, pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos que contribuem para meu crescimento científico e intelectual.

Ao Prof. Dr. Cristiano Xavier Lima por sua coorientação, por nos fornecer dados de tipagem de HLAs de uma corte de doadores de órgão, de pacientes transplantados e na fila de transplante no Hospital Felício Rocho.

À Dra. Valéria Valim e ao Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho por doar amostras sanguíneas de uma coorte vacinal contra febre amarela.

Ao Doutor Rafael Formenton Cita pela tipagem dos HLAs de uma coorte vacinal contra febre amarela.

Aos colegas do Laboratório de Imunoparasitologia, um grupo fantástico, pois sempre me deram apoio científico e metodológico. Pelos momentos de diálogo e aprendizado, sou muito grato a todos os imparinos (obs: fiquei com medo de escrever nomes e esquecer o de alguém, seria uma injustiça).

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG),

Ao departamento de Bioquímica e Imunologia e à UFMG.

Ao Prof. Dr. Olindo Assis, Profa. Dra. Liza Figueiredo e Profa. Dra. Mariana Torquato por gentilmente revisar este trabalho.

A meus pais Isabel e George, e minha vó Carmen pelo amor e exemplo que me dão.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização de este trabalho e, para meu crescimento pessoal e científico.

**O Meu Muito Obrigado A Todos!!!**

## RESUMO

A febre amarela (YF) é uma doença febril hemorrágica causada pelo vírus da febre amarela (YFV) e é responsável por 29.000 a 60.000 mortes anualmente. Estima-se que mais de 700 milhões de pessoas não vacinadas vivem em áreas de risco de infecção, sugerindo que a YF tem um potencial extremamente alto de causar impacto na saúde da população e encargo financeiro para os sistemas de saúde. A YF pode ser prevenida através de vacinação com o vírus atenuado YF-17DD, que induz anticorpos neutralizantes associados à imunidade protetora contra a YF em 92 a 98% dos indivíduos vacinados. A porcentagem de 2 a 8% de falhas na vacinação contra YF ainda não é bem compreendida. Uma possível razão para as falhas na vacinação, pode ser a apresentação antigênica defeituosa pelos repertórios de Antígeno Leucocitário Humano (HLA) do vacinado. Aqui, levantamos a hipótese de que os casos de falha vacinal contra a YF ocorrem em indivíduos com repertórios de HLA composto por alelos incapazes de apresentar eficientemente os antígenos do YF-17DD. Para testar nossa hipótese, usamos métodos de bioinformática baseados em redes neurais artificiais para prever as interações dos antígenos do YF-17DD e do YFV mais propensos a se ligarem os alelos de HLA estudados aqui, e usamos essa informação para criar um *score* e classificar os alelos de HLA de acordo a sua capacidade em interagir com epítomos do YFV e do YF-17DD. Posteriormente, utilizamos o *score* de cada alelo de HLA para pontuar o repertório de HLA-I e HLA-II de indivíduos imunizados com a vacina YF-17DD, e correlacionamos a pontuação dos repertórios de HLAs de cada indivíduo, com sua capacidade para produzir anticorpos neutralizantes contra o YF-17DD 28 dias após vacinação. Encontramos que indivíduos com repertórios de HLAs com pontuações mais altas, ou seja, indivíduos com repertórios de HLAs compostos por alelos que tem alta capacidade para interagir com as proteínas do YF-17DD, apresentaram título de anticorpos neutralizantes anti-YF-17DD mais altos, quando comparado com os indivíduos que tem repertórios de HLAs com pontuação baixa. Esses achados sugerem que a presença de HLAs com alto número de interações com peptídeos do YF-17DD no repertório de um indivíduo, está relacionado com sua capacidade para produzir anticorpos neutralizantes anti-YF-17DD, o que estaria correlacionado com imunidade protetora contra YF.

**Palavras chave:** Vírus da Febre Amarela. Vírus vacinal contra a febre amarela. Antígeno Leucocitário Humano. Falha da vacina.

## **ABSTRACT**

Yellow fever (YF) is a febrile hemorrhagic disease caused by the yellow fever virus (YFV) and is responsible for 29,000 to 60,000 deaths annually. It is estimated that more than 700 million unvaccinated people live in areas at risk of infection, suggesting that YF has an extremely high potential to have an impact on population health and a financial burden on health systems. YF can be prevented through vaccination with the attenuated YF-17DD virus, which induces neutralizing antibodies associated with protective immunity against YF in 90 to 98% of vaccinated individuals. The percentage of 2 to 10% of YF vaccination failures is still not well understood. A possible reason for vaccination failures may be defective antigen presentation by the vaccinated Human Leukocyte Antigen (HLA) repertoires. Here, we hypothesize that cases of YF vaccine failure occur in individuals with HLA repertoires composed of alleles incapable of efficiently presenting YF-17DD antigens. To test our hypothesis, we used bioinformatics methods based on artificial neural networks to predict the interactions of the YF-17DD and YFV antigens most likely to bind to the HLA alleles studied here, and we used this information to create a score to classify the HLA alleles studied here. HLA alleles according to their ability to interact with YFV and YF-17DD epitopes. Subsequently, we used the score of each HLA allele to score the HLAs-I and HLAs-II repertoire of individuals immunized with the YF-17DD vaccine and correlated the scores of each individual's HLA repertoires with their ability to produce antibodies. neutralizing agents against YF-17DD 28 days after vaccination. We found that individuals with HLA repertoires with higher scores, that is, individuals with HLA repertoires composed of alleles that have a high capacity to interact with YF-17DD proteins, had higher anti-YF-17DD neutralizing antibody titers when compared with individuals who have low-scoring HLA repertoires. These findings suggest that the presence of HLAs with a high number of interactions with YF-17DD peptides in an individual's repertoire is related to their ability to produce neutralizing anti-YF-17DD antibodies, which would be correlated with protective immunity against YF.



**Keywords:** Yellow Fever Virus. Yellow fever vaccine virus. Human Leukocyte Antigen.  
Vaccine failure.

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Organização do genoma e funções das proteínas do YFV.....	20
<b>Figura 2:</b> Ciclo infeccioso dos <i>Flavivirus</i> .....	21
<b>Figura 3:</b> Diferenças moleculares entre a poliproteína do YFV-17D e YFV.....	22
<b>Figura 4:</b> Respostas imune inatas e adaptativas contra o YF-17D.....	23
<b>Figura 5:</b> Estrutura das moléculas do Antígeno Leucocitário Humano de classe I e classe II.....	28
<b>Figura 6:</b> Vias de processamento e apresentação antígenos.....	30
<b>Figura 7:</b> Análise da capacidade de apresentação de antígenos de HCMV pelos HLAs de classe I mais comuns na população.....	32
<b>Figura 8:</b> Afinidade geral dos vinte e sete HLAs-I e dos vinte e sete HLAs-II mais prevalentes pela poliproteína do YFV e YF-17DD.....	42
<b>Figura 9:</b> Immunogenicidade das proteínas virais.....	44
<b>Figura 10:</b> Interações significativas dos cinquenta e quatro HLAs mais prevalentes com peptídeos da proteína NS5 e da proteína C do YF-17DD.....	45
<b>Figura 11:</b> <i>Score</i> da capacidade dos HLAs de classe I e II mais prevalentes para interagir com as proteínas do YF-17DD e do YFV.....	49
<b>Figura 12:</b> Comparação do <i>score</i> da capacidade dos HLAs-I para apresentar antígenos do YF-17DD e de outros vírus.....	51
<b>Figura 13:</b> Comparação do <i>score</i> da capacidade dos alelos de HLA-II para apresentar antígenos do YF-17DD e de outros vírus.....	52
<b>Figura 14:</b> Os HLAs A e B tem maior número de inteirações com as proteínas do YF-17DD do que os HLAs-C.....	53

**Figura 15:** Existem indivíduos com repertórios de HLAs-I com ampla ou baixa capacidade predita para apresentar antígenos do YF-17DD e podem ter ampla ou baixa capacidade para apresentar antígenos de outros vírus.....54

**Figura 16:** Existem indivíduos com repertórios de HLA-DR com ampla ou baixa capacidade predita para apresentar antígenos do YF-17DD e podem ter ampla ou baixa capacidade para apresentar antígenos de outros vírus.....55

**Figura 17:** indivíduos com repertórios de HLAs A, B e DR capazes de fazer alto ou baixo número de interações com as proteínas do YF-17DD apresentam maior ou menor título de anticorpos neutralizantes contra o YF 17DD.....57

## Lista de tabelas

- Tabela 1:** Representação da aplicação dos *scores* para pontuar indivíduos de acordo com sua capacidade para apresentar antígenos dos vírus estudados.....38
- Tabela 2:** Interações das proteínas do YFV e o YF-17DD com os cinquenta e quatro HLAs mais prevalentes.....44
- Tabela 3:** Interações significativas dos vinte e sete HLA-I mais prevalentes na população mundial com peptídeos das proteínas do YF-17DD e do YFV.....46
- Tabela 4:** Interações significativas dos vinte e sete HLA-II mais prevalentes na população mundial com peptídeos das proteínas do YF-17DD e do YFV.....47

## Lista de abreviaturas

**YF:** febre amarela

**YFV:** vírus da febre amarela

**YF-17D:** vírus atenuado da febre amarela

**YF-17DD:** sub-linhagem do vírus atenuado da febre amarela (passagens 287-289)

**YF-17D-204:** sub-linhagem do vírus atenuado da febre amarela (passagens 235-240)

**NHPs:** espécies de primatas não humanos

**ZIKV:** vírus Zika

**DENV:** vírus dengue

**C:** proteína do capsídeo

**E:** proteína do envelope

**prM:** pre-proteína de membrana

**M:** proteína de membrana

**NS:** proteínas não estruturais

**RNA:** ácido ribonucleico

**DCs:** células dendríticas

**TLRs:** receptores do tipo toll

**MDA5:** proteína 5 associada à diferenciação de melanoma

**RIG:** receptores do tipo RIG

**PAMP:** padrões moleculares associados a patógeno

**IFN:** interferão

**CD:** cumulo de diferenciação

**NK:** células *natural killer*

**HLA:** antígeno leucocitário humano

**Th:** Linfócito T auxiliar

**IL:** interleucina

**TNF:** fator de necrose tumoral

**PPR:** receptor do reconhecimento de padrão

**FcR:** receptor da fração cristalizável de anticorpos

**TCR:** receptor de célula T

**MHC:** complexo principal de histocompatibilidade

**CITA:** proteína ativadora de transcrição da classe I

**CIITA:** proteína ativadora de transcrição da classe I

**APC:** célula apresentadora de antígenos

**aa:** aminoácido

**ER:** reticulo endoplasmático

**CLIP:** peptídeo da cadeia invariante associado ao HLA de classe II

**AIDS:** síndrome de imunodeficiência adquirida

**ANN:** rede neural artificial

**PSSMs:** matrizes de pontuações específicas

**HCMV:** Citomegalovírus Humano

**PRNT:** técnica de neutralização por redução do número de placas de lise

**CHIKV:** vírus Chikungunya

**SARS-CoV-2:** coronavírus de tipo 2 causante da síndrome respiratória agudo severo

**IEDB:** *Immune Epitope Data Base*

**DNA:** acido desoxirribonucleico

**Fc:** Fragmento cristalizado.

**FcR $\gamma$ :** Receptor para porção Fc de anticorpos classe  $\gamma$

**Tris-HCl:** trisaminometano

**KCl:** cloruro de potasio

**MgCl<sub>2</sub>:** cloreto de magnésio

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**NaCl:** cloreto de sódio

**LSDS:** dietilamida de ácido lisérgico

**K:** potássio

**TE:** tampão TE (solução de Tris-HCl e EDTA)

**TAE:** tampão Tris-Acetato-EDTA

## Sumario

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	35
2.1. Objetivo Geral.....	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
3.1. Proteínas virais analisadas.....	36
3.2. HLAs estudados.....	36
3.3. Predição da afinidade dos HLA da classe I e II com epítomos preditos nas proteínas dos vírus estudados.....	36
3.4. Desenvolvimento de um <i>score</i> para classificar os alelos de HLA de classes I e II de acordo a sua capacidade de interação com os antígenos.....	37
3.5. Aplicação do <i>score</i> .....	38
3.6. Teste do <i>score</i> em repertórios de HLAs de uma coorte vacinal para febre amarela.....	39
3.6.1 Extração de DNA e tipagem do HLAs de uma coorte vacinal para febre amarela.....	39
3.6.2 Lise do coágulo sanguíneo.....	39
3.6.3 Extração do DNA.....	40
3.6.4 Precipitação de DNA.....	40
3.6.5 Tipagem HLAs de uma coorte vacinal para febre amarela.....	40
3.6.6 Pontuação do repertório de HLAs de indivíduos de uma coorte vacinal para febre amarela.....	41
3.7. Representação gráfica dos dados e análises estatísticas.....	41
<b>4. RESULTADOS</b> .....	42
4.1. Todas as proteínas do YFV e do YF-17DD tem peptídeos preditos capazes de interagir com os vinte e sete HLA de classes I e os vinte e sete de HLA de classes II mais prevalentes.....	42
4.2. Existem HLAs com ampla e baixa capacidade predita para apresentar antígenos do YFV e do YF-17DD.....	45

<b>4.3.</b> Desenvolvimento do <i>score</i> para classificar HLAs de acordo com sua capacidade para ligar antígenos do YF-17DD e do YFV.....	48
<b>4.4.</b> A capacidade de interação peptídeo-HLA do repertório de indivíduos com ampla ou pouca capacidade predita para interagir com antígenos do YF-17DD é espelhada para outros vírus.....	50
<b>4.5.</b> Os HLAs A e B tem maior número de interações com as proteínas do YF-17DD do que os HLAs-C.....	53
<b>4.6.</b> Indivíduos com repertórios de HLA A, B e DRB1 capazes de fazer alto número de interações com as proteínas do YF-17DD apresentam alto título de anticorpos neutralizantes contra o YF-17DD após vacinação.....	56
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	67
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	68



## 1. INTRODUÇÃO

A febre amarela (YF; do inglês, *yellow fever*) é uma doença hemorrágica viral aguda causada pela infecção do vírus da febre amarela (YFV; do inglês, *yellow fever virus*) o qual é transmitido entre humanos principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti* (REED et al., 1900). Na maioria dos casos de YF, os sintomas incluem febre, dor de cabeça, icterícia, dores musculares, náuseas, vômitos e fadiga. Entre o 25 e 50% dos pacientes que contraem a doença desenvolvem sintomas graves e aproximadamente metade deles morrem em 7 a 10 dias após infecção (WHO, 2021).

O YFV é um patógeno endêmico de áreas tropicais da África, América do Sul e Central. Circula principalmente em florestas tropicais através de um ciclo de transmissão selvático no qual os mosquitos da selva, principalmente dos gêneros *Haemogogus*, *Sabethes* e *Aedes*, transmitem o vírus entre espécies de primatas não humanos (NHPs; do inglês non-human primates) e, secundariamente, para humanos não imunizados que entram na floresta. Os humanos infectados na floresta carregam o vírus para cidades onde pode ocorrer um ciclo de transmissão urbana no qual os mosquitos *Aedes aegypti* urbanos são infectados com o YFV ao se alimentar de pessoas infectadas, e posteriormente o transmitem a pessoas saudáveis não imunizadas. Dessa forma, os mosquitos espalham o YFV transmitindo-o de pessoas infectadas para pessoas saudáveis causando o desenvolvimento de surtos de YF. Nas savanas úmidas da África, o YFV também pode apresentar um ciclo de transmissão intermediário em que mosquitos peridomésticos se infectam e transmitem o vírus quando se alimentam de NHPs infectados, e humanos saudáveis respectivamente; causando assim, pequenos surtos de YF humana em zonas rurais ou aldeias que fazem limites com áreas selváticas. Os humanos que são infectados nas aldeias, levam o vírus às cidades densamente povoadas onde pode ocorrer o ciclo de transmissão urbana. Este tipo de transmissão intermediária é observada majoritariamente na África (SOPER et al., 1933; GARDNER; RYMAN, 2010; BARRETT; HIGGS, 2006; QUEREC et al., 2009; MONATH, 2005).

A YF é prevenida por uma vacina extremamente eficaz desenvolvida a partir da atenuação do YFV. Em 1932, os pesquisadores Max Theiler, Eugen Haagen e Hugh Smith cultivaram o YFV em meio de cultivo contendo embrião de camundongo e na passagem número 18, o vírus foi transferido para meio de cultivo contendo embrião de galinha. Após 58 passagens nesse meio, o YFV foi transferido para um meio de

cutivo com embrião de galinha sem cérebro e sem medula espinhal por mais de 128 passagens. Após mais de 200 passagens por esses meios, o YFV foi atenuado e sua atenuação foi confirmada através da inoculação em macacos rhesus, observando-se que causava apenas uma infecção generalizada sem carga viral significativa e sem provocar hepatite nem encefalite fulminante (principal característica patogênica da infecção pelo YFV). Além disso, os animais inoculados com o novo vírus atenuado que foi chamado 17D, ganharam resistência ao YFV altamente virulento (THEILER; SMITH, 1937; BARRETT, 2017).

Estes resultados tão promissores permitiram o teste do vírus da febre amarela atenuado (YF-17D) num grupo limitado de humanos, demonstrando ser seguro e eficaz na indução de imunidade protetora contra a YF (THEILER; SMITH, 1937) Em 1937, Smith e colaboradores desenvolveram um projeto no Brasil, conseguindo vacinar mais de 59 mil pessoas e demonstraram que anticorpos neutralizantes contra YFV apareciam no sangue dos indivíduos vacinados entre oito e vinte dias após a vacinação (SMITH et al., 1938). Desde 1937 até hoje, o vírus atenuado YF-17D (em suas duas sub-linhagens, a 17D-204 e a 17DD que estão nas passagens 235-240 e 287-289, respectivamente) é utilizado como vacina contra a YF, capaz de induzir proteção em 90 a 98% dos indivíduos vacinados por cerca de 30 a 35 anos (BARRETT; TEUWEN, 2009; GOTUZZO; YACTAYO; CÓRDOVA, 2013; CO et al., 2002; NIEDRIG et al., 1999).

Embora, há mais de 90 anos que possuímos uma vacina extremamente eficaz e segura contra a YF, ainda se tem grande dificuldade em erradicá-la. Este fato pode ser justificado porque o YFV é mantido por mosquitos e NHPs nas florestas tropicais, podendo ser introduzido em populações humanas cada vez que pessoas não imunizadas são infectadas na floresta e levam o vírus até as grandes populações humanas com pouca ou nenhuma imunidade a YF (GARSKE et al., 2014; SHEARER et al., 2017).

Historicamente, no Brasil, tem sido relatada uma ampla circulação do YFV e recentemente entre os anos de 2016 e 2019 uma agressiva reemergência de YF ocorreu atingindo principalmente os estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Bahia, Santa Catarina e Paraná (DELATORRE et al., 2019; SILVA et al., 2020). Esse surto atingiu cerca de 2.251 pessoas causando mais de 800 mortes, representando um aumento em 2.82 vezes o número total de casos, e 1.57

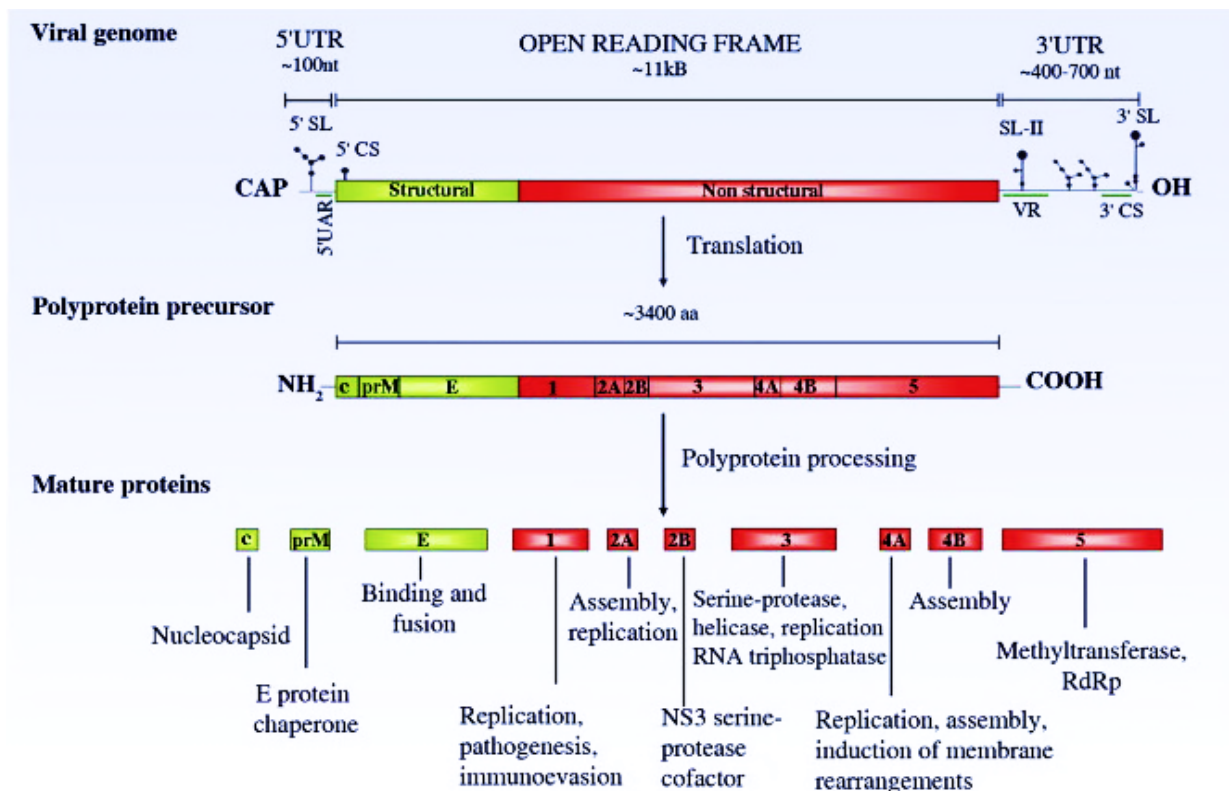
vezes a soma das mortes por YF nos últimos 36 anos (de 1980 a 2015; SILVA et al., 2020; SACCHETTO et al., 2020).

Em geral, estima-se que anualmente ocorram entre 80 mil e 300 mil casos e cerca de 30.000 a 60.000 mortes por YF em áreas endêmicas. Além disso, acredita-se que mais de 473 milhões de pessoas não vacinadas em 34 países africanos e 394 milhões de pessoas não vacinadas em 14 países da América do Sul e Central vivam em risco de infecção (WHO, 2021) sugerindo que a YF tem potencial para causar um impacto ainda maior na saúde da população, e encargo financeiro para os sistemas de saúde.

O YFV é membro protótipo da família Flaviviridae e está incluído dentro do gênero *Flavivirus* onde também se inclui o vírus Zika (ZIKV; do inglês, *Zika virus*) e o vírus da dengue (DENV; do inglês, *dengue virus*) (KUNO et al., 1998). O YFV possui um envelope formado por uma bicamada lipídica, na qual são inseridas duas proteínas chamadas proteína do envelope (E) e proteína de membrana (M). A partícula viral tem formato esférico e diâmetro de aproximadamente 50 nm. Abaixo do envelope viral há um nucleocapsídeo com diâmetro de aproximadamente 30 nm, composto por um capsídeo icosaédrico, formado por uma proteína chamada proteína do capsídeo (C) a qual está complexada ao genoma viral composto por uma molécula de RNA de fita simples, com polaridade positiva (RNA+). O RNA viral codifica uma única poliproteína de ~3411 aminoácidos que é clivada co- e pós-traducionalmente por uma serino-protease codificada pelo genoma viral (NS2B/NS3) e pelas proteases da célula hospedeira (sinalase e furina) para dar origem a 10 proteínas virais. Dentre essas 10 proteínas, tem três proteínas estruturais: a proteína C, a proteína E e a prM que depois é clivada a proteína M. Além das três proteínas estruturais, a poliproteína viral também dá origem a sete proteínas não estruturais (NS) denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. As proteínas estruturais estão relacionadas com a manutenção da estrutura viral e interação com as células hospedeira (Figura 1). Já as proteínas NS estão envolvidas na replicação do RNA viral, montagem da partícula viral e modulação das repostas do hospedeiro (Figura 1) (FERNANDEZ et al 2009).

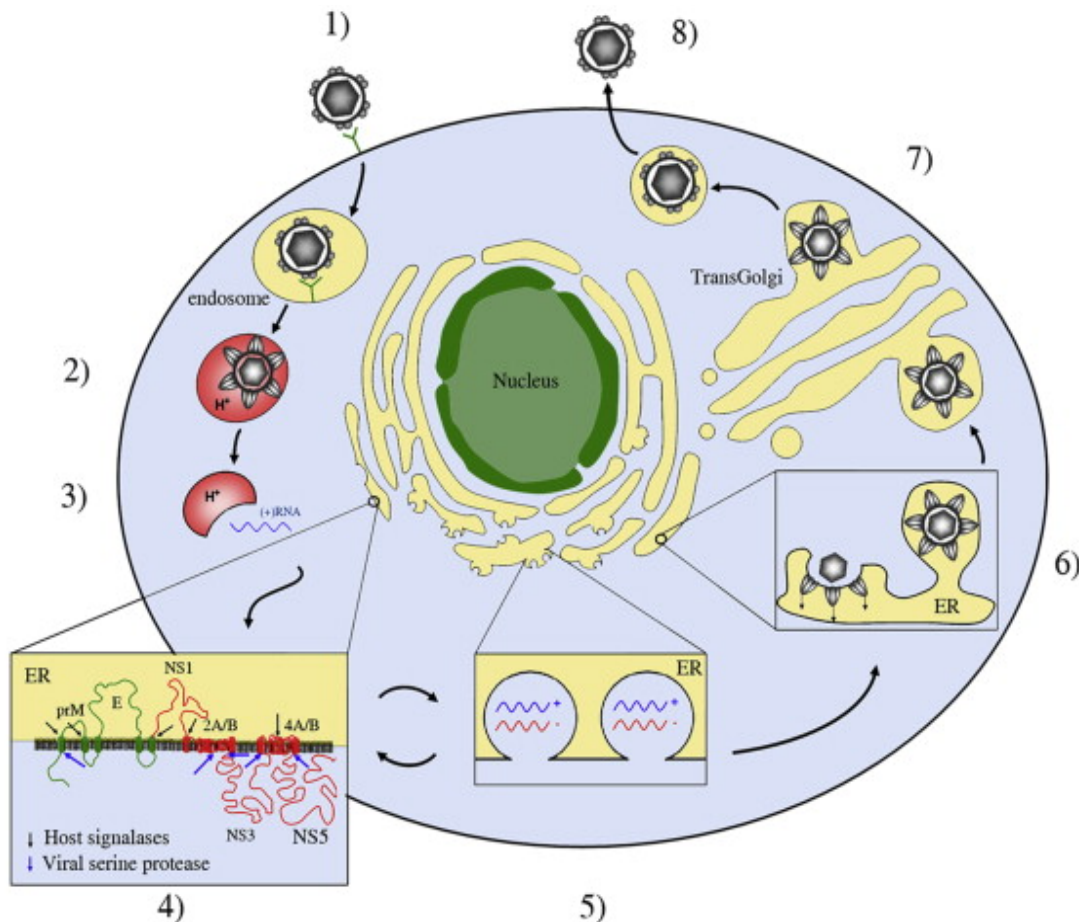
A infecção com o YFV (ou com YF-17D) inicia quando o vírus é internalizado pelas células hospedeiras incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs; do inglês, *dendritic cells*) através de endocitose mediada por receptor (por exemplo DC-SIGN (CD209)).

As vesículas endocíticas que contêm o vírus são fusionadas com os endossomos onde o ambiente ácido promove um rearranjo conformacional na glicoproteína E, expondo um domínio de ligação que leva à fusão da membrana viral com as proteínas da membrana do fagolisossomo e à liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (LEE; LOBIGS, 2008; BRESSANELLI et al., 2004; ZHANG et al., 2004). O RNA viral então é traduzido na poliproteína viral e após sua tradução, um RNA sentido negativo (RNA-) (complementar ao RNA genômico) é sintetizado para depois ser copiado a RNA+ e assim dar origem a novas cópias do genoma viral. O RNA- serve como um modelo para fazer várias cópias de RNA+ que são empacotados para formar vírions descendentes (figura 2) (ISSUR et al., 2009; FERNANDEZ et al 2009). Após a síntese e processamento dos componentes do vírus, a montagem da partícula viral ocorre em membranas restruturadas que atuam como uma "armação" para ancorar o RNA viral, as proteínas virais e os componentes da célula hospedeira envolvidos na replicação viral (figura 2). Acredita-se que a montagem da partícula viral inicie quando o RNA+ recém-sintetizado seja revestido com a proteína C. Em seguida, uma



**Figura 1. Organização do genoma e funções das proteínas do YFV.** O genoma do YFV é composto por RNA de fita simples de sentido positivo. Codifica uma única poliproteína que é clivada de forma co e pós-traducionalmente em três proteínas estruturais (verde) e sete proteínas não estruturais (vermelho). As funções dessas proteínas durante a infecção são descritas. Fonte: modificado de (FERNANDEZ *et al* 2009).

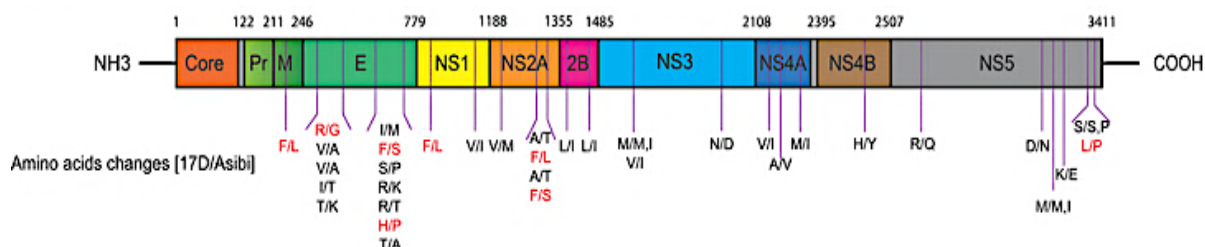
bicamada lipídica derivada do ER onde tinham sido ancorados heterodímero das proteínas prM-E envola o nucleocapsídeo formando uma partícula viral imatura. Durante a montagem e exocitose da partícula viral, a disposição de prM nos heterodímero prM-E impede a fusão prematura de E às membranas intracelulares. A maturação das partículas virais ocorre durante o seu processo de saída da célula, na rede *trans*-Golgi, onde a prM é clivada a M por uma furina celular, junto com rearranjo conformacional da proteína E que agora pode se ligar a proteínas das células que infectará o vírus (APTE-SENGUPTA; SIROHI; KUHN, 2014). As partículas agora



**Figura 2. Ciclo infeccioso dos Flavivirus.** Os Flavivirus são internalizados por endocitose mediada por receptor (1) e trafegados para os endossomos, onde o ambiente ácido induz a fusão (2) entre a membrana do vírus e a membrana do endossomo, resultando na liberação do genoma viral no citoplasma da célula (3). A tradução do RNA viral é seguida pelo processamento da poliproteína viral por enzimas virais e do hospedeiro (4). Os locais de clivagem e a topologia das proteínas estruturais (verde) e não estruturais (vermelho) na membrana do retículo endoplasmático (ER) são ilustrados esquematicamente. Após a tradução, um complexo de replicação é montado e associado às membranas induzidas pelo vírus, onde ocorre a replicação viral (5). O complexo de replicação começa a transcrever o RNA+ para RNA- que então serve como modelo para a nova síntese de RNA+. As cadeias de RNA+ podem iniciar um novo ciclo de tradução ou ser montadas em vírions (6). O empacotamento ocorre na superfície do RE, seguido pelo brotamento das proteínas estruturais e do RNA recém-sintetizado no lúmen do RE. Os vírions imaturos resultantes são transportados na rede *trans*-Golgi, onde a clivagem mediada por furina da proteína prM em M gera partículas infecciosas maduras (7) que são liberadas por exocitose (8) Fonte: Modificado de (FERNANDEZ et al 2009).

maduras são liberadas por exocitose para o meio extracelular onde poderão interagir com outras células e infectá-las (figura 2) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; LORENZ et al., 2003).

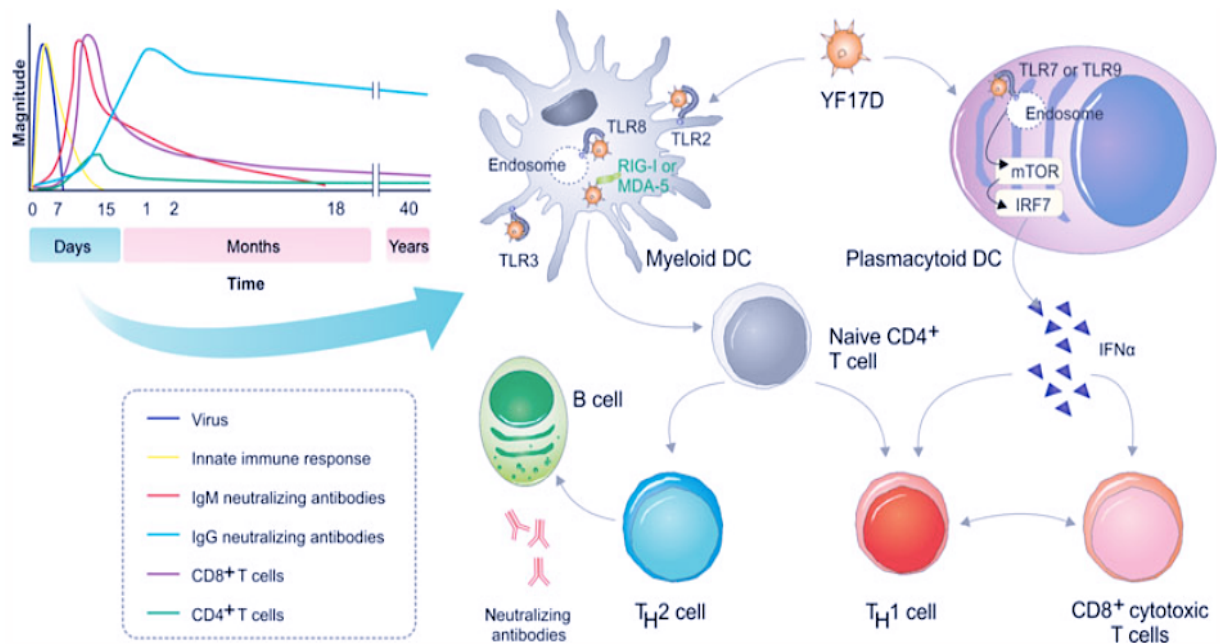
Embora a poliproteína do vírus YF-17D difira da poliproteína do YFV em apenas 32 substituições de aminoácidos e 68 nucleotídeos no genoma viral (com diferenças extras dependendo do clone de YFV) (Figura 3) (HAHN et al., 1987; SACCHETTO et al., 2020), a infecção por uma dessas linhagens virais leva a resultados de doença totalmente opostos. Os mecanismos precisos da patogênese do YFV e da potente imunogenicidade do YF-17D ainda não são claramente compreendidos (SACCHETTO et al., 2020; DOUAM; PLOSS, 2018; HAHN et al., 1987). Dados obtidos a partir de análises da resposta imune de indivíduos vacinados com YF-17D tem mostrado que o vírus vacinal ativa a resposta imune inata através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRR; do inglês, *Pattern Recognition Receptors*), como os receptores tipo toll (TLRs; do inglês, *Toll-like receptors*) 2, 3, 7, 8 e 9 (BARBA-SPAETH et al., 2005; QUEREC et al., 2006), a proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (MDA5; do inglês, *melanoma differentiation-associated protein 5*) e também através dos receptores do tipo RIG (RLR; do inglês, *RIG-like receptors*) (GARDNER; RYMAN, 2010; PULENDRAN et al., 2013; DA COSTA NEVES et al., 2009). Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP; do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) do YF-17D e o reconhecimento dos PAMPs virais, leva à ativação do sistema imune envolvendo principalmente a ativação das células dendríticas convencionais e plasmocitoides. As DCs plasmocitoides e todas as outras células do corpo que são infectadas por vírus secretam interferons (IFNs; do inglês, *interferons*) do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), os quais promovem um estado antiviral impedindo a progressão da infecção (PERRY et al.,



**Figura 3. Diferenças moleculares entre a poliproteína do YFV-17D e YFV.** Localização das diferenças de aminoácidos na poliproteína do YFV-17D e na poliproteína do YFV. São mostradas as 32 mutações de aminoácidos entre as duas linhagens, bem como três mutações adicionais (M/M,I ou S/S,P) devido a diferenças clonais das linhagens de YFV. Fonte: Modificado de (DOUAM; PLOSS, 2018)

2005). Além disso, também se observa um aumento na frequência de monócitos ativos com alta expressão de CD14+CD16+. Essas células coordenam a resposta inflamatória local, fagocitando e destruindo os patógenos no local de infecção (MARTINS et al., 2008).

Durante os primeiros dias após vacinação, observa-se um aumento na frequência de células *natural killer* (NK; do inglês, *natural killer*) ativas que matam as células infectadas com baixa expressão de moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA; do inglês, *human leukocyte antigen*) e produzem IFN- $\gamma$  que auxiliam na ativação de outras células do sistema imune inato como as DCs e a os macrófagos, e também promovem um ambiente que favorece a diferenciação dos linfócito T *naive* em linfócitos T auxiliar do tipo 1 (Th1) (COOK; WAGGONER; WHITMIRE, 2014). Estas observações sugerem que nos estágios iniciais da infecção por YF-17D, a ativação de DCs e células NK é provavelmente crítica para proporcionar uma proteção



**Figura 4. Respostas imune inatas e adaptativas contra o YF-17D.** A vacinação com YF-17D resulta em uma infecção viral aguda que atinge o pico no dia 5 com uma redução gradual até o dia 7 se tornando indetectáveis no dia 14 após a vacinação. A vacinação induz uma rápida ativação do sistema imune inato através da ativação de vários subconjuntos de DCs via PPR. As DCs ativas apresentam os antígenos aos linfócitos T promovendo o desenvolvimento de uma resposta Th1/Th2 que influencia na produção e persistência de anticorpos neutralizantes. O título de anticorpos neutralizantes IgM, atingem o pico no dia 8 após vacinação e depois diminuem, mas podem ser detectados por até 18 meses após a vacinação. Já os anticorpos neutralizantes IgG específicos para o vírus se desenvolvem mais lentamente e podem persistir por até 35 anos após vacinação. A resposta de linfócitos T CD8+ específicas para vírus se desenvolve rapidamente após a imunização, com pico no dia 15 após vacinação. O YF-17D também ativa o mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) em DCs plasmocitoides, por meio de um mecanismo dependente de TLR7, e isso leva à fosforilação do fator regulador do interferon 7 (IRF7, do inglês, *interferon regulatory factor 7*). Isso resulta na indução de IFN- $\alpha$ , que ativa os linfócitos T CD8+. Fonte modificado de (PULENDRAN et al., 2013).

relativamente imediata contra a infecção por YF-17D e estabelecer um meio para promover a imunidade adaptativa subsequente.

As DCs ativadas durante a infecção com YF-17D processam os antígenos do vírus e estimulam a resposta imune adaptativa que finalmente elimina o YF-17D do corpo. Após a vacinação com o YF-17D, a viremia atinge seu pico no dia 5 apresentando, então, redução até o dia 7, tornando-se indetectável no dia 14 (AKONDY et al., 2015). A queda dos níveis virais é acompanhada da aparição de linfócitos T CD4+ ativos que apresentam um perfil auxiliar misto de tipo Th1 e Th2, linfócitos T CD8+ ativos e de anticorpos neutralizantes anti-YF-17D (figura 4).

Os linfócitos T CD8+ ativados após vacinação respondem a epítomos conservados da poliproteína do YF-17D com o YFV (HAHN et al., 1987; SACCHETTO et al., 2020) e apresentam um perfil de ativação polifuncional que secreta múltiplas citocinas, como IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , MIP1- $\beta$  e a citocina promotora de proliferação interleucina (IL)-2, e enzimas efetoras. Quase todos os linfócitos T CD8+ específicos para YF-17D expressam granzima B, sugerindo que podem degranular e, provavelmente são capazes de matar as células infectadas pelo YF-17D eliminando assim os reservatórios virais (BLOM et al., 2013; KONGSGAARD et al., 2017; PERDOMO-CELIS et al., 2019).

Já os linfócitos T CD4+ específicos para antígenos do YF-17D exercem suas funções efetoras auxiliando outras células do sistema imune para potenciar os mecanismos efetores da imunidade celular e molecular. Elas produzem citocinas do tipo Th1 como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que ativam os macrófagos para que destruam os microrganismos fagocitados e auxiliem aos linfócitos T CD8+ para que exerçam suas funções efetoras (imunidade celular) (OISHI; MANABE, 2018). Linfócitos T CD4+ específicos para antígenos do YF-17D também apresentam um perfil funcional Th2 que produz citocinas como IL-4 que auxilia aos linfócitos B a produzirem anticorpos neutralizantes contra o YF-17D (imunidade humoral) (MINTZ; CYSTER, 2020; LAW et al., 2020)

Os linfócitos B ativados pelos antígenos do YF-17D se tornam células plasmocitoides de vida longa e secretam anticorpos neutralizantes que protegem contra a YF até 35 anos após vacinação (POLAND, J. D. et al 1981). Esses anticorpos protegem contra a reinfecção pelo YF-17D ou da infecção pelas linhagens selvagem do YFV através da neutralização direta da ligação aos receptores das células



hospedeira, remoção viral dependente do receptor Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R), lise do vírus ou de células infectadas via sistema de complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (LU et al., 2018).

Além das populações de linfócitos T e B que após a vacinação se diferenciam em linfócitos efetores antígeno-específicos ao YF-17D, uma fração de linfócitos ativadas também se diferencia em células de memória que retêm o fenótipo polifuncional por muitos anos (BLOM et al., 2013; PERDOMO-CELIS et al., 2019; SOPER et al., 1933; GARDNER; RYMAN, 2010; BARRETT; HIGGS, 2006; QUEREC et al., 2009; MONATH, 2005). Dentre essas células de memória, os linfócitos B, circulam no sangue e residem em tecidos de mucosa e outros tecidos esperando um reestímulo pelo antígeno para produzir rapidamente altas quantidades de anticorpos para neutralizar o antígeno (LU et al., 2018). Por outro lado, os linfócitos T que se diferenciam em linfócitos T de memória estão prontos para produzir citocinas ou para matar as células infectadas ao encontrar o antígeno que reconhecem. Dentre os linfócitos T de memória, a subpopulação de linfócitos T de memória central recirculam entre os órgãos linfoides e são responsáveis pela rápida expansão clonal subsequente à reexposição ao antígeno. Outra subpopulação denominada linfócitos T de memória efetora reside nos tecidos de mucosa e outros tecidos periférico, e medeiam suas funções efectoras rapidamente quando se reencontram com o antígeno. Uma terceira população de linfócitos T de memória denominada linfócitos T de memória residente tecidual, reside na pele e nas mucosas sendo incapazes de entrar novamente na circulação. Estas células medeiam respostas secundárias e rápidas aos antígenos no caso deles serem encontrados (GERRITSEN; PANDIT, 2016; JAMESON; MASOPUST, 2018; MARTIN; BADOVINAC, 2018). Dos aproximadamente 2000 clones de células T CD8<sup>+</sup> que respondem ao YF-17D após vacinação, entre cinco a seis por cento se diferenciam em várias populações de memórias central e efetora (DEWITT et al., 2015).

Diversos estudos comparativos tentaram descobrir diferenças virais e imunológicas entre a infecção por YFV e YF-17D, sendo relatado que em células endoteliais, células de Kupffer e células dendríticas derivadas de monócitos, o YFV causa uma resposta pró-inflamatória maior e mais prolongada do que YF-17D (WOODSON; FREIBERG; HOLBROOK, 2011; KHAIBOULLINA et al., 2005). Outros estudos *in vivo* identificaram que o domínio III da proteína E do YF-17D tem um papel

central na determinação da ligação de YF-17D aos receptores das células hospedeiras, menor disseminação e maior atenuação (LEE; LOBIGS, 2008; MCELROY et al., 2008), sugerindo que as diferenças de 12 aminoácidos entre a glicoproteína do envelope de YF-17D e YFV, é um dos principais determinantes da patogenicidade e atenuação do YFV e YF-17D respectivamente (LEE; LOBIGS, 2008; MCELROY et al., 2008). Tem sido observado também que DCs infectadas com YF-17D sofrem menos apoptose (BARBA-SPAETH et al., 2005); isso pode permitir que as DCs viajem para os nódulos linfáticos mais próximos e promovam interações eficazes com os linfócitos T para apresentar os antígenos do YF-17D e ativá-los (BARBA-SPAETH et al., 2005; PALMER et al., 2007). Curiosamente, as DCs derivadas de monócitos infectados com YF-17D, mas não as infectadas com YFV, promovem maior produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 em linfócitos T CD4+ (CONG et al., 2016), sugerindo que as interações específicas vírus-hospedeiro em células apresentadoras de antígeno promovem o aumento da iniciação dos linfócitos T e imunidade adaptativa durante a infecção por YF-17D.

Como discutido anteriormente, o resultado da vacinação com o YF-17D é o desenvolvimento de linfócitos T e B de memória e anticorpos neutralizantes que defendem o corpo da YF (COSTA-ROCHA et al., 2019; MELO et al., 2013; WIETEN et al., 2016; COSTA-ROCHA et al., 2019; BASTOS et al., 2014; GÓMEZ; OCAZONEZ, 2008; NIEDRIG et al., 1999; POLAND et al., 1981). Esse fato denota, entre outras coisas, uma apresentação eficiente dos antígenos, uma vez que a diferenciação e proliferação dos linfócitos T e B em linfócitos efetoras e de memória, requer o reconhecimento do antígeno como principal sinal estimulador para sua ativação. Para a adequada apresentação dos antígenos, as DCs capturam os antígenos de qualquer parte do corpo e os levam até os linfonodos onde constantemente circulam os linfócitos T *naive*. No linfonodo, o receptor de célula T (TCR, do inglês *T-cell receptor*) *naive* reconhece o antígeno exibido pelas DCs. O estímulo induzido pelo antígeno e outras moléculas implicadas na ativação dos linfócito T, como moléculas co-estimuladoras e citocinas induzidas pelo microrganismo, levam cada clone reativo de linfócito T *naive* a se tornar um linfócito ativo, a se expandir, e a exercer suas funções efetoras contra o antígeno tal como foi discutido anteriormente.

Para que o TCR possa reconhecer os antígenos, os antígenos devem ser apresentados nas moléculas do HLA. As moléculas do HLA são glicoproteínas altamente polimórficas codificadas por genes do complexo genético mais variável do genoma humano conhecido como HLA, e conhecido também em outros mamíferos como complexo principal de histocompatibilidade (MHC; do inglês, *major histocompatibility complex*). O HLA está localizado no braço curto do cromossomo 6 e contém dois tipos de genes: os genes da classe I (HLA-I), e os genes da classe II (HLA-II) (MESTER; HOFFMANN; STEVANOVIĆ, 2011). Cada indivíduo tem três genes de HLAs de classe I, chamados *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, os quais codificam as moléculas de classe I denominadas HLA-A, -B e -C. Cada indivíduo tem também três *loci* genéticos que codificam as moléculas de classe II denominadas HLA-DP, -DQ e -DR. Cada molécula de HLA-II é composta por um heterodímero de polipeptídios  $\alpha$  e  $\beta$ . Os *loci* DP, DQ e DR em cada cromossomo contém genes separados designados *A* e *B*, que codificam as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , respectivamente.

Todo indivíduo expressa alelos do HLA herdados de ambos os pais, maximizando o número de moléculas de HLA disponíveis para se ligarem a peptídeos para apresentação aos linfócitos T. Um indivíduo heterozigoto pode expressar até seis moléculas diferentes da classe I; codificadas pelos dois alelos dos genes *A*, *B* e *C*.

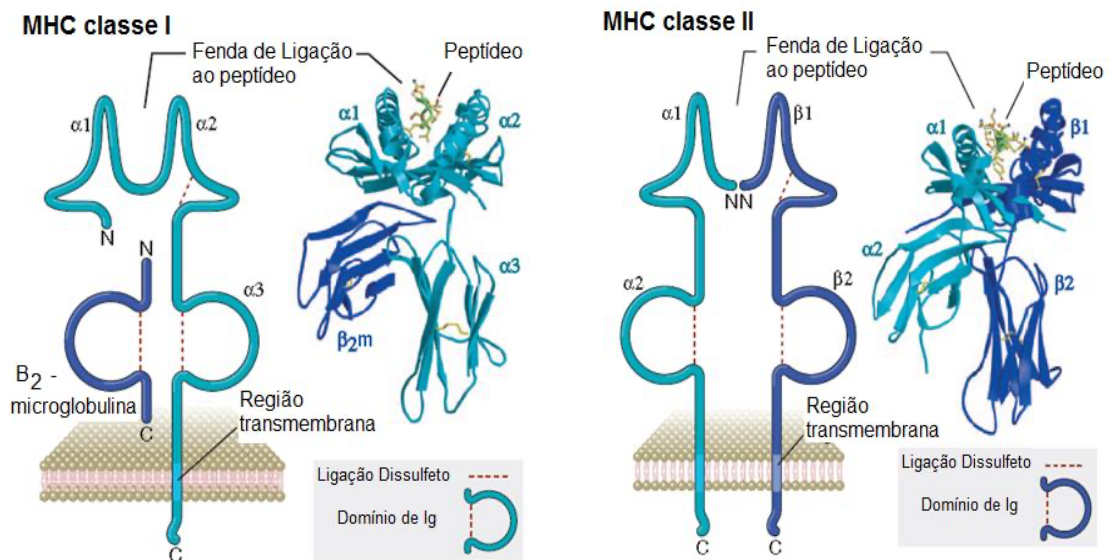
Todo indivíduo herda um gene *DPA* e um gene *DPB* que codificam, respectivamente, as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da molécula HLA-DP; um gene *DQA* e um gene *DQB*; um gene *DRA* e um ou dois genes *DRB*. Por tanto, cada indivíduo é capaz de expressar de seis a oito pares de moléculas de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do HLA-II, um conjunto de cada gene *DP* e *DQ*, e um ou dois de *DR*. Dessa forma, o repertório de HLAs de um indivíduo pode ser constituído por até seis moléculas diferentes da classe I e por seis a oito pares de moléculas de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da classe II, isso confere uma grande diversidade de combinações alélicas em cada classe de HLA, possibilitando que um indivíduo tenha uma imensa capacidade de apresentação de antígenos (MESTER; HOFFMANN; STEVANOVIĆ, 2011).

As moléculas de HLA-I são expressas constitutivamente em todas as células nucleadas e são responsáveis por apresentar aos linfócitos T CD8+ os antígenos derivados de proteínas oriundas do interior das células (NEEFJES et al., 2011). As moléculas do HLA-II são expressas principalmente em APC, como as DCs, linfócitos B, macrófagos, e células do epitélio tímico, e são responsáveis por apresentarem aos

linfócitos T CD4+ os antígenos derivados de proteínas processadas nos endossomos (ADAMS; LUOMA, 2013).

A expressão das moléculas do HLA é regulada por fatores de transcrição que se ligam à proteína ativadora de transcrição da classe I (CITA, do inglês *class I transcription activator*) e da classe II (CIITA). Um complexo composto por fatores de transcrição e CITA ou CIITA, liga-se aos promotores das regiões do *HLA-I* ou *HLA-II* atuando como reguladores-mestres da expressão do HLA (DOWNS et al., 2016). Ainda que a expressão das moléculas de HLA-I seja constitutiva em todas as células nucleadas, a frequência de sua expressão pode ser aumentada pelo IFN-I, que é produzido durante a resposta imune inata iniciada pelo reconhecimento de PAMPs virais. A frequência da expressão de moléculas do HLA-II pode ser aumentada pela estimulação com IFN- $\gamma$ , produzido pelas células NK nas fases iniciais da resposta imune inata e pelos linfócitos T ativos na resposta imune adaptativa intensificando a apresentação dos antígenos.

A estrutura das moléculas do HLA-I tem um formato similar a uma taça, que fica ancorada na superfície das células nucleadas, composta por uma cadeia

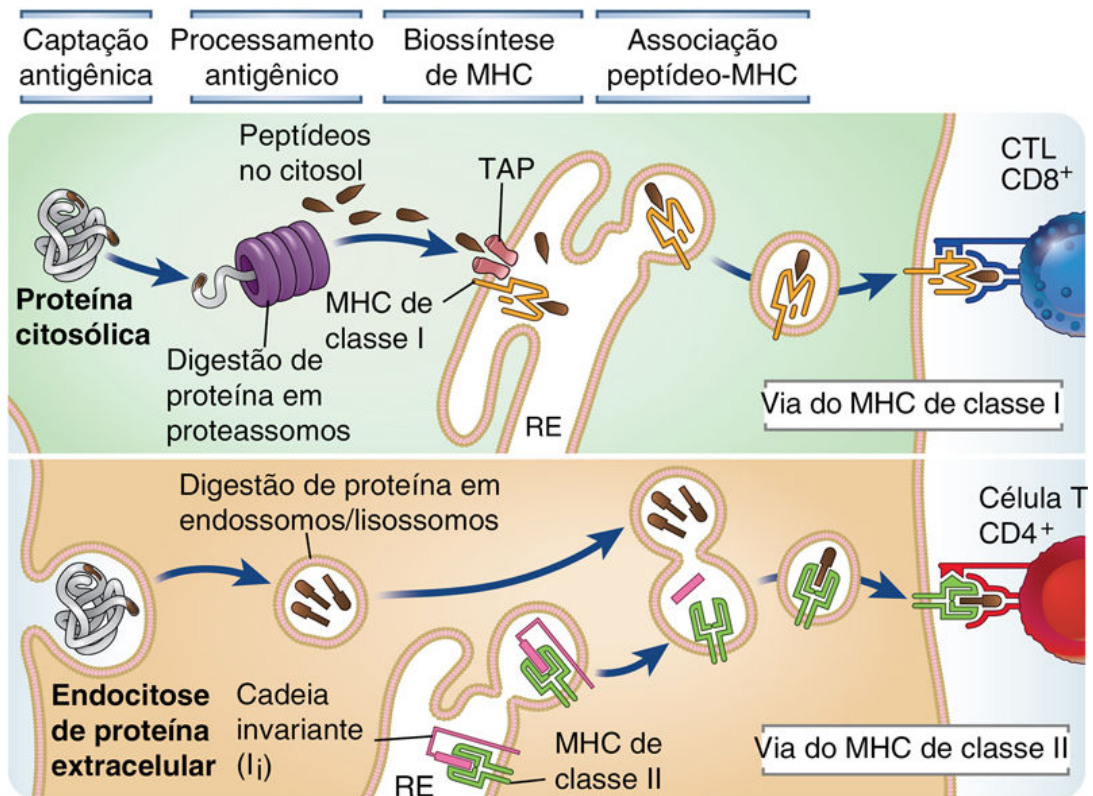


**Figura 5. Estrutura das moléculas do Antígeno Leucocitário Humano de classe I e classe II.** O diagrama esquemático (à esquerda) ilustra as diferentes regiões das moléculas de HLA. **A**, as moléculas classe I são compostas por uma cadeia  $\alpha$  polimórfica ligada de forma não covalente à  $\beta_2$ -microglobulina não polimórfica. A cadeia  $\alpha$  é glicosilada. O diagrama em formato de fita (à direita) mostra a estrutura da porção extracelular da molécula HLA-B27 ligada a um peptídeo, exibido por cristalografia de raio X. **B**, as moléculas de classe II são compostas por uma cadeia  $\alpha$  polimórfica ligada de forma não covalente à cadeia  $\beta$  polimórfica. As duas cadeias são glicosiladas. O diagrama em formato de fita (à direita) mostra a estrutura da porção extracelular da molécula HLA-DRB1 ligada a um peptídeo, exibido por cristalografia de raio X. Fonte: modificado de: (ABBAS A.K. LICHTMAN A. H. AND SHIV PILLAI, 2018)

polipeptídica  $\alpha$  e por uma cadeia invariante de  $\beta$ 2-microglobulina que confere estabilidade a estrutura da molécula para se fixar na membrana celular (Figura 5). Já a estrutura da molécula de HLA-II é similar ao formato de um cachorro-quente (supondo que o pão é a molécula de HLA e a salsicha o antígeno) que fica na superfície das APCs. É composta por uma cadeia polipeptídica  $\alpha$  e uma  $\beta$  ligadas não covalentemente (Figura 5). A parte externa de moléculas do HLA-I ( $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2) e do HLA-II ( $\alpha$ 1 e  $\beta$ 2) forma uma fenda de união ao antígeno constituída por aminoácidos polimórficos que criam um padrão para cada alelo. Nessa fenda se encaixam os peptídeos processados pelas células para serem apresentados aos linfócitos T (JANEWAY et al., 2001). Os peptídeos processados não precisam se ligar fielmente a todos os aminoácidos presentes na fenda de cada alelo de HLA e por isso, cada alelo do HLA apresenta ampla especificidade para ligação peptídica, contrastando com a especificidade fina do reconhecimento antigênico do TCR (HAMMER et al., 1994).

Para os antígenos serem apresentados nas moléculas do HLA, eles devem ser processados e integrados às moléculas de HLA intracelularmente. Para fazer isso, as células têm diferentes vias de processamentos de antígenos dependendo da origem dos antígenos e da classe de HLA onde serão apresentados. Isso, para garantir que os linfócitos T reconheçam antígenos do meio intracelular e extracelular. Os antígenos derivados de proteínas oriundas do interior da célula normalmente são apresentados nas moléculas do HLA-I. Seu processamento se inicia pela ação dos proteassomos que fragmentam as proteínas em peptídeos de 8 a 12 aa que posteriormente são transportados para o ER pelas proteínas associadas ao processamento (TAP1 e TAP2; do inglês, *transporter associated with antigen processing*). No ER, o peptídeo se encaixa na fenda de ligação, presente na superfície das moléculas de HLA-I. Em seguida, o complexo HLA-I-peptídeo é transportado à superfície celular através da via secretória e exibido na superfície celular, onde pode interagir com o TCR de linfócitos T CD8+ (figura 6) (MERCADO et al., 2015). Já os antígenos apresentados nas moléculas do HLA-II normalmente são peptídeos derivados de proteínas internalizadas e processadas nos endossomos tardios e nos lisossomos das APCs, incluindo as proteínas extracelulares capturadas por endocitose; proteínas de superfície celular que estão sendo endocitadas e degradadas; e proteínas intracelulares que podem ser ligadas à membrana, proteínas vesiculares ou

citossólicas, incluídas aquelas aprisionadas nos autofagolisossomos durante o processo de autofagia. O processamento das proteínas internalizadas acontece nos endossomos onde são digeridas até peptídeos de 10 a 30 aa (sendo comprimento ideal de 12 a 16 aa). As moléculas de HLA-II são montadas no RE pela associação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  com a cadeia invariante, uma proteína que evita a ligação ao peptídeo antigênico e transporta o heterodímero de HLA-II no endossomo. No endossomo, a cadeia invariante é degradada por proteases/catepsinas até que sobre apenas o peptídeo da cadeia invariante associado ao HLA de classe II (CLIP, do inglês *class II-associated invariant chain peptide*) que se mantém associado à fenda da molécula de HLA e protegido das proteases. O CLIP é removido da molécula de HLA-II pelo HLA-DM e o peptídeo é, então, associado à molécula de HLA-II. O complexo peptídeo-HLA-II é transportado para a superfície celular onde pode interagir com o TCR dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (figura 6) (ADAMS; LUOMA, 2013)

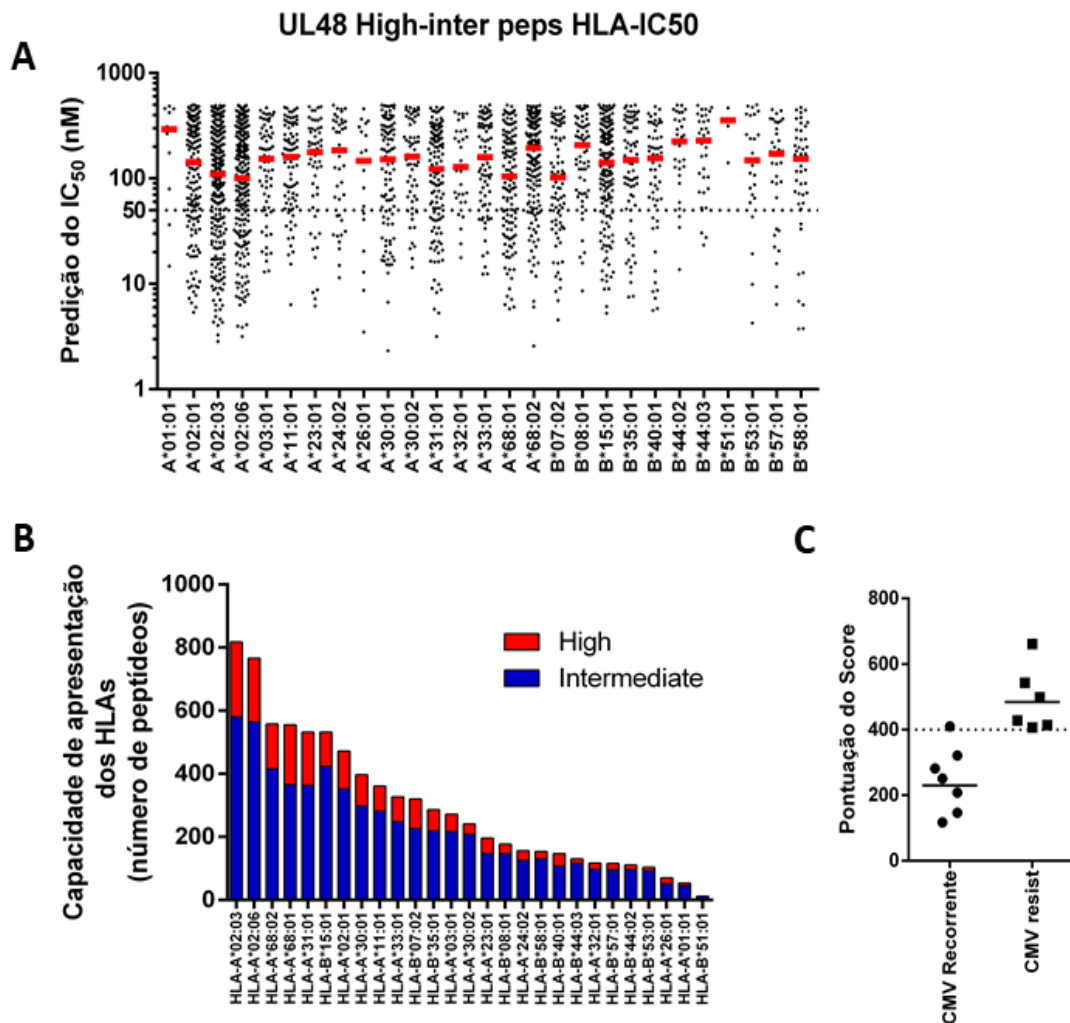


**Figura 6. Vias de processamento e apresentação de antígenos.** Na via do HLA-I (painel superior), os antígenos proteicos no citosol são processados pelos proteassomos, e os peptídeos são transportados para o interior do retículo endoplasmático (RE), onde se ligam às moléculas do HLA-I. O complexo peptídeo-HLA-I é transportado para fora da célula pela via secretora e expresso na superfície celular. Na via do MHC de classe II (painel inferior), os antígenos proteicos degradados nos lisossomos se ligam a moléculas do HLA de classe II e o complexo peptídeo-HLA-I é transportado para fora da célula pela via secretora e expresso na superfície celular. Fonte: modificado de (ABBAS A.K. LICHTMAN A. H. AND SHIV PILLAI, 2018)

As análises cristalográficas por raios X dos complexos HLA-peptídeo tem fornecido informação definitiva sobre como os peptídeos se ligam à fenda dos HLAs, e sobre os resíduos de cada componente que participa na ligação. Esta informação tem sido utilizada para gerar algoritmos computadorizados capazes de prever os peptídeos de qualquer proteína mais propensos a se ligar as moléculas do HLA e ainda predizer sua força de ligação (MARTINI et al., 2020; JURTZ et al., 2017; KIM et al., 2012; WANG et al., 2008; WANG et al., 2010; VITA et al., 2019). Esta abordagem que combina imunologia experimental e ciências da computação, tem crescido muito nos últimos anos e estas novas ferramentas fornecem à comunidade científica métodos de investigação nos mais variados campos da ciência. Neste contexto de processamento e apresentação de antígenos, há um grande número de programas e bancos de dados que auxiliam no estudo de cada uma das etapas. Os estudos no desenvolvimento de imunoterapias baseados em peptídeos utilizam a imunoinformática em diferentes pesquisas contra o câncer e doenças causadas por vírus como hepatite C, Herpes Simplex, Zika, Dengue, AIDS e outras (CHAUHAN; SINGH; RATHO, 2018; JAMES et al., 2020; ALI et al., 2017; MEDLOCK et al., 2017; MEI et al., 2020). Descobrir a afinidade de ligação entre o repertório de HLA do indivíduo e os peptídeos que serão apresentados ao TCR pode auxiliar por exemplo no desenvolvimento de vacinas cada vez mais precisas e medicamentos mais eficazes. Atualmente temos várias técnicas computacionais que predizem sequências peptídicas e sua força de ligação com as diferentes moléculas de HLA, entre elas destacam-se a técnica de rede neural artificial (ANN), modelos ocultos de Markov, matrizes de pontuações específicas (PSSMs) e amostragem de Gibbs. O modelo de ANN têm a função de calcular a relação entre variáveis e auxilia na resposta à diversas perguntas biológicas, no entendimento sobre células, moléculas, vias regulatórias e mecanismos de feedback fisiológicos. Diversas são as organizações que utilizam este modelo, como por exemplo o *Immuno Epitope Database* (IEDB) que conta com ferramentas de análise de epítomos, processamento de antígenos, entre outros (NIELSEN et al., 2003; MARTINI et al., 2020; KIM et al., 2012).

Em nosso laboratório, temos utilizado técnicas de bioinformáticas como ANN para predizer o número de interações e força de ligação entre HLAs e epítomos do Citomegalovírus Humano (HCMV). Usando essa informação criamos um *score* baseado no número de interações significativas (interações com IC50 predito menor

que 500 nM) de cada HLA com epítomos do HCMV. Testamos esse *score* em dois grupos de pacientes transplantados, um que teve complicações recorrentes por HCMV no pós-transplante e num que não teve problemas relacionados HCMV. O resultado foi que pacientes que tiveram problemas de infecção recidiva por HCMV no pós-transplante apresentaram uma combinação de HLAs péssimos apresentadores



**Figure 7. Análise da capacidade de apresentação de antígenos de HCMV pelos HLAs de classe I mais comuns na população.** Analisamos a imunogenicidade de 10 proteínas de HCMV por ferramenta de predição de epítomos nos 27 HLA de classe I mais comuns na população. Verificamos que alguns HLAs possuem uma baixa capacidade de apresentação, enquanto outros HLAs parecem ser capazes de se ligar a muitos epítomos. (A) Exemplo do comportamento preditivo de apresentação de vários HLAs (indicados no eixo x) a peptídeos da proteína UL48 com a indicação dos IC<sub>50</sub> preditos (eixo Y). Cada símbolo representa um peptídeo diferente que se liga no HLA indicado. (B) Número de peptídeos de afinidade alta (high) ou intermediária (intermediate) capazes de se ligar aos diversos HLAs, considerando-se as 10 proteínas mais imunogênicas do CMV. (C) Exemplo de aplicação do *score* em 7 pacientes transplantados que tiveram infecção recorrente por CMV e em 6 pacientes que não tiveram infecção por CMV após o transplante (CMV resist).



de antígenos do HCMV em seu repertório de HLA de classe I e, portanto, uma baixa pontuação no *score* que desenvolvemos (figura 7).

Por outro lado, Melo e colaboradores mostraram elegantemente que as respostas de linfócitos T de memória contra YF-17D são direcionadas a peptídeos que se ligam a vários tipos de moléculas de HLA-I e II específicas; sugerindo que indivíduos com repertório de HLA que têm um alto número de interações com os peptídeos do YF-17D são mais propensos a ativar linfócitos T *naive* e desenvolver linfócitos T de memória (MELO et al., 2013). Curiosamente, outros autores demonstraram que alguns epítomos importantes do YF-17D são restritos a alguns alelos de HLA, do qual pode-se deduzir que só podem ser apresentado por esses determinados HLAs restringindo assim a apresentação antigênica (JAMES et al., 2013; MATEUS et al., 2020). Entretanto, um estudo sistemático sobre a amplitude das interações entre HLAs I e II com os antígenos do YFV e YF-17DD e sua relação com os casos de falha vacinal (vista em 2 a 8% dos indivíduos vacinados com YF-17D) ainda não foi realizado.

Tendo em mente os achados de nosso grupo e inseridos neste contexto da literatura, levantamos a hipótese de que os casos de falha na vacinação contra a YF ocorrem em indivíduos com repertório de HLA incapaz de apresentar eficientemente os antígenos do YF-17DD. Acreditamos que conhecer as interações entre os HLA-I e HLA-II com as proteínas do YF-17DD e YFV pode nos ajudar a entender a falha vacinal e a desenhar melhores estratégias de imunização. Para testar nossa hipótese, usamos métodos de bioinformática baseados em redes neurais artificiais para prever as interações dos antígenos do YF-17DD e do YFV mais propensos a se ligarem os alelos de HLA estudados aqui, e usamos essa informação para criar um *score* para classificar os alelos de HLA de acordo a sua capacidade em interagir com epítomos do YFV e do YF-17DD. Posteriormente, utilizamos o *score* de cada alelo de HLA para pontuar o repertório de HLAs-I e HLAs-II de indivíduos imunizados com a vacina YF-17DD, e correlacionamos a pontuação dos repertórios de HLAs de cada indivíduo, com sua capacidade para produzir anticorpos neutralizantes contra o YF-17DD 28 dias após vacinação. Encontramos que os indivíduos com repertórios de HLAs com pontuações mais altas, ou seja, indivíduos com repertórios de HLAs compostos por alelos que tem alta capacidade para interagir com as proteínas do YF-17DD, apresentaram título de anticorpos neutralizantes anti-YF-17DD mais altos, quando

comparado com os indivíduos que tem repertórios de HLAs com pontuação baixa. Esses achados sugerem que a presença de HLAs com alto número de interações com peptídeos do YF-17DD no repertório de um indivíduo, está relacionado com sua capacidade para produzir anticorpos neutralizantes anti-YF-17DD, o que estaria correlacionado com imunidade protetora contra YF.

## 2. OBJETIVOS

### 21. Objetivo geral

Determinar o grau de interação de HLA de classe I e II com os peptídeos antigênicos do YFV e do YF-17DD, sua relação com os polimorfismos do HLA e com a resposta vacinal contra a febre amarela.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar HLAs com capacidade de apresentação ampla (bons HLAs) e restrita (HLAs ruins) para epítomos de YFV e YF-17DD.
- Comparar a capacidade de apresentação desses HLAs (bons e ruins) para apresentar peptídeos de outros vírus como DENV, ZIKV, CHIKV e SARS-CoV-2.
- Desenvolver um *score* para pontuar o repertório de HLA de classe I e de classe II de pacientes na fila de transplantes no Hospital Felício Rocho para avaliar a qualidade de repertórios de HLA quanto a apresentação de epítomos de YFV, YF-17DD, DENV, ZIKV, CHIKV e SARS-CoV-2.
- Testar o *score* predito no repertório de HLAs de indivíduos com casos de falha ou sucesso vacinal identificados através da produção de anticorpos neutralizantes contra o YF-17DD.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Proteínas virais analisadas**

Neste trabalho utilizamos as sequências peptídicas das proteínas estruturais C, prM e E, e não estruturais NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e, NS5 do YFV, YF-17DD, ZIKV e DENV1 depositadas no site UniProt (<https://www.uniprot.org/>) com código de acesso Q98803 para YFV; P03314 para YF-17D (17DD); A0A024B7W1 para ZIKV e P27909 para DENV1. Também usamos as sequencias peptídica das proteínas capsídeo, proteína 6K, E3, E2 e E1 do vírus Chikungunya e a replicase polyprotein 1ab do SARS-CoV-2 depositadas no site UniProt com código de acesso número Q8JUX5 e P0DTD1 respetivamente.

#### **3.2 HLAs estudados**

Inicialmente, em este estudo foram incluídos os vinte e sete alelos de HLAs da classe I e os vinte e sete alelos de HLAs da classe II mais prevalentes na população mundial. Posteriormente, devido à grande diversidade de alelos de HLAs na população brasileira, foram adicionados mais 23 alelos de HLA-I e 9 alelos de HLA-II. No total, foram incluídos 86 alelos de HLAs sendo 50 HLA-I e 36 HLAs-II.

#### **3.3 Predição da afinidade dos alelos de HLA da classe I e II com epítomos preditos nas proteínas dos vírus estudados**

Epítomos compatíveis para se ligar nos HLA de classe I e II em todas as proteínas virais estudadas foram preditos utilizando as ferramentas de imunoinformática disponíveis no site da *Immune Epitope Data Base* (IEDB) (<https://www.iedb.org/>). Esse banco armazena dados que contribuem com a caracterização de anticorpos e epítomos de linfócitos T de humanos e outras espécies de mamíferos, incluindo epítomos relacionados com doenças infecciosas, alergia, autoimunidade e transplantes. Além disso, a IEDB também possui ferramentas de

predição e análise de epítomos para linfócitos B e de várias etapas de processamento e apresentação de antígenos.

Para prever os epítomos mais propensos a se ligarem aos 50 HLA-I e aos 36 HLA-II analisados neste estudo, as sequências peptídicas de cada uma das proteínas retiradas do UniProt, foram analisadas nas ferramentas imunoinformáticas disponibilizadas pela IEDB. Especificamente utilizamos as ferramentas *predição T Cell Epitopes – MHC I Binding Prediction*, e *T Cell Epitopes – MHC II Binding Prediction* que preveem as sequências peptídicas mais propensas a se ligarem a determinadas moléculas de HLA e sua força de ligação (IC50) através do mecanismo de redes neurais artificiais (ANN).

Após as ferramentas predizerem os epítomos com maior propensão a se ligarem às moléculas de HLA, uma matriz de dados com valores de predição foi gerada, e através dela, pudemos identificar o valor de IC50 para as interações HLA-peptídeos preditas em diferentes regiões das proteínas submetidas às ferramentas.

Para facilitar a exploração dos dados gerados pelas ferramentas, as matrizes de dados foram selecionadas e exportadas para o aplicativo Microsoft Excel. Dessa forma, foi possível separar em grupos distintos os HLAs que interagem mais ou menos com as proteínas dos vírus estudados. Dessa forma, as interações HLA-peptídeo com IC50 predito menor que 50 nM foram consideradas de alta afinidade, interações com IC50 entre 50 nM e 500 nM foram consideradas de afinidade intermediária e interações acima de 500 nM foram consideradas de baixa afinidade. A maioria dos epítomos relevantes conhecidos tem afinidade alta ou intermediária. Alguns epítomos têm baixa afinidade, mas nenhum epítomo de linfócito T conhecido tem um valor de IC50 superior a 5000.

### **3.4 Desenvolvimento de um score para classificar os alelos de HLA de classes I e II de acordo a sua capacidade de interação com os antígenos.**

Para o desenvolvimento do score que classifica cada alelo de HLA de acordo com sua capacidade para ligar antígenos dos vírus estudados, contamos as interações preditas entre cada alelos de HLA estudados com os epítomos preditos nas proteínas virais, e criamos um score para cada alelo de HLA-I e HLA-II baseados no número de interações (HLA-peptídeo) significativas (interações com IC50 <500 nM).

Esses *scores* refletem a capacidade de apresentação predita por ferramentas de bioinformática para cada alelo HLA.

### 3.5 Aplicação do *score*

Posteriormente, os *scores* foram aplicados no repertório de HLAs-I e II de 1278 indivíduos de uma corte de doadores de órgão, de pacientes transplantados e na fila de transplante no Hospital Felício Rocho. Todos os indivíduos foram convidados e informados para participar neste estudo, e assinaram os termos de consentimentos de participação nesta pesquisa que conta com aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CAAE nº 77877417.9.1001.5125).

Para a aplicação do *score*, somamos o valor do *score* de cada HLA no repertório de cada paciente, e dessa forma conseguimos pontuar cada indivíduo de acordo com a sua capacidade predita para apresentar antígenos dos vírus estudados (tabela 1).

Note-se que para alguns HLAs (em ambas as classes I e II) não foi possível prever um *score* de interação com as proteínas virais devido a limitações nas ferramentas de predição de interações. Esta limitação levou à exclusão de mais de 900 indivíduos nesta fase do estudo devido à ausência de previsão de *score* para HLAs menos comuns porque há poucos dados experimentais disponíveis para gerá-las.

	A1	A2	B1	B2	C1	C2	PONTUAÇÕES
<b>PACIENTE 1</b>	A*24:02	A*24:02	B*18:01	B*18:01	C*05:01	C*05:01	<b>Pontuação P1</b>
<i>score</i> dos alelo	202	202	29	29	23	23	508
<b>PACIENTE 2</b>	A*01:01	A*25:01	B*08:01	B*18:01	C*07:01	C*12:03	<b>Pontuação P2</b>
<i>score</i> dos alelo	472	184	71	29	13	84	853
<b>PACIENTE 3</b>	A*23:01	A*03:01	B*08:01	B*45:01	C*03:04	C*16:01	<b>Pontuação P3</b>
<i>score</i> dos alelo	233	251	71	x	x	x	x

**Tabela 1: Representação da aplicação dos *scores* para pontuar indivíduos de acordo com sua capacidade para apresentar antígenos dos vírus estudados.** A pontuação de cada paciente é determinada pela somatória do *score* dos 6 alelos do repertório de HLA-I. Note que alguns alelos (B\*45:01, C\*03:04 e C\*16:01) não tem *score* predito, isso devido a que para esses alelos ainda não existem ferramentas de previsão porque há poucos dados experimentais disponíveis para gerá-las.

### **3.6 Teste do score no repertório de HLAs de uma coorte vacinal para febre amarela**

Para testar nosso score da capacidade de apresentação de antígenos de cada HLA e compará-lo com dados biológicos (sucesso ou falha vacinal contra YF); tipificamos os repertórios de HLA de uma corte de indivíduos com casos retrospectivos de falhas ou sucessos vacinais contra YF descritos anteriormente em (VALIM et al., 2020). De forma geral, indivíduos saudáveis e indivíduos diagnosticados com doenças autoimunes, IgG-negativos para YFV, foram imunizados com a vacina YF-17DD. Vinte e oito dias após a vacinação, ensaios de neutralização por redução do número de placas de lise (PRNT<sub>50</sub>) foram feitos para avaliar o status de imunidade (soroconversão) contra o YF-17DD.

Noventa e quatro amostras de coágulos sanguíneos (39 de indivíduos saudáveis e 55 de indivíduos diagnosticados com doenças autoimunes) de uma coorte vacinal para febre amarela foram gentilmente doadas pela Doutora Valéria Valim e pelo Prof. Dr. Olindo Assis.

O estudo anteriormente mencionado (VALIM et al., 2020) foi submetido e aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes da Universidade Federal do Espírito Santo (CAAE 65910317.0.0000.5071, aprovação nº 2.411.738/2017). O consentimento informado foi obtido de todos os participantes.

#### **3.6.1 Extração de DNA e tipagem do HLAs de uma coorte vacinal para febre amarela**

Para a tipagem de alelos de HLAs de uma coorte vacinal para febre amarela, o DNA total foi extraído de cada amostras de coágulo sanguíneo seguindo os seguintes passos.

#### **3.6.2 Lise do coágulo sanguíneo.**

Cem miligramas de coágulo de cada amostra foram colocados em um tubo (Falcon) de 15 mL e foram macerados usando macerador de tecidos em 450µL de tampão de lise composto por 10 mmol/L de Tris-HCl (pH = 8.0); 10 mmol/L KCl; 10

mmol/L  $MgCl_2$ ; 2 mmol/L EDTA (pH 8.0); 0,4 mol/L NaCl e 10 g/L LSDS. Posteriormente foram adicionados 5  $\mu$ L de proteinase K (20mg/ml) (Sigma REF: P2308 LOTE: 89941). Em seguida a mistura foi vortexada por 15 segundos e incubada durante a noite a 37°C.

### **3.6.3 Extração do DNA**

Após o lisado, os coágulos foram transferidos para tubos (Eppendorf) de 2mL e foram adicionados 450 $\mu$ L de fenol:clorofórmio:alcoólisoamílico em proporções 25:24:1 e foi homogeneizado por inversão até formar uma emulsão.

Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 1200g/10min e a fase aquosa foi transferida para outro tubo no qual foi novamente adicionado 450 $\mu$ L de fenol:clorofórmio:alcoólisoamílico (25:24:1) e foi centrifugado à 1200g/10min. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo e foi adicionado 700 $\mu$ L de clorofórmio, mistura e centrifugado a 1200g/10min. O sobrenadante contendo o DNA foi novamente coletado.

### **3.6.4 Precipitação de DNA**

Para precipitar o DNA, primeiro foram adicionados 60  $\mu$ L de acetato de sódio 3M e 1400 $\mu$ L de etanol 100% gelado. A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada à 5000g/5min. O sobrenadante foi descartado e o DNA ficou no fundo do tubo.

Posteriormente o DNA foi lavado duas vezes com 400 $\mu$ L de etanol 70% livre de nuclease e precipitado através de centrifugação à 5000g/5min. Em seguida o álcool foi descartado por inversão e o tubo ficou aberto à temperatura ambiente até o excesso de álcool evaporar. Depois disso o DNA foi ressuscitado em 50 $\mu$ L de TE e estocado a 4°C. O DNA foi dosado através de espectrometria no NanoDrop e a integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1.5% preparado em 50 mL TAE e adicionou-se 8 $\mu$ L de Brometo de etídio. A eletroforese foi feita a 100 watts durante 25 mim.

### **3.6.5 Tipagem de HLAs de uma coorte vacinal para febre**



A tipagem em alta resolução dos repertórios de HLAs da coorte vacinal para febre amarela foi feita em colaboração com o Doutor Rafael Formenton Cita coordenador da divisão de Imunologia Dos Transplantes-HLA e Virologia do Hospital de Amor de Barretos – São Paulo. Foi usado o kit AlloSeq Tx (CareDX®) seguindo as instruções do fabricante. De forma geral, uma amostra de DNA genômico é preparada usando transposons ligados a esferas. Cada amostra é indexada e agrupada num único tubo. Os genes de interesse (*HLA-A -C -C -D -E -F -G -H, -DRB1//3/4/5, -DQA1 -DQB1,-DPA1 -DPB1, MICA MICB*) são capturados com sondas biotiniladas e enriquecidos para sequenciamento num sistema de fluorescência. Em seguida os dados de sequenciamento são analisados usando o software AlloSeq Assign através do qual se identificaram os alelos dos genes *HLA-A -C -C -D -E -F -G -H, -DRB1//3/4/5, -DQA1 -DQB1,-DPA1 -DPB1, MICA MICB*.

### **3.6.6 Pontuação do repertório de HLAs de indivíduos de uma coorte vacinal para febre amarela**

Após descobrir os alelos que compõem o repertório de HLA-I e HLA-II de nossa coorte vacinal contra febre amarela; calculamos a pontuação de seus repertórios de HLA-I e HLA-II e correlacionamos sua pontuação da capacidade de apresentação de antígeno do YF-17DD com o título de anticorpos anti-YF-17DD (PRNT) 28 dias após vacinação.

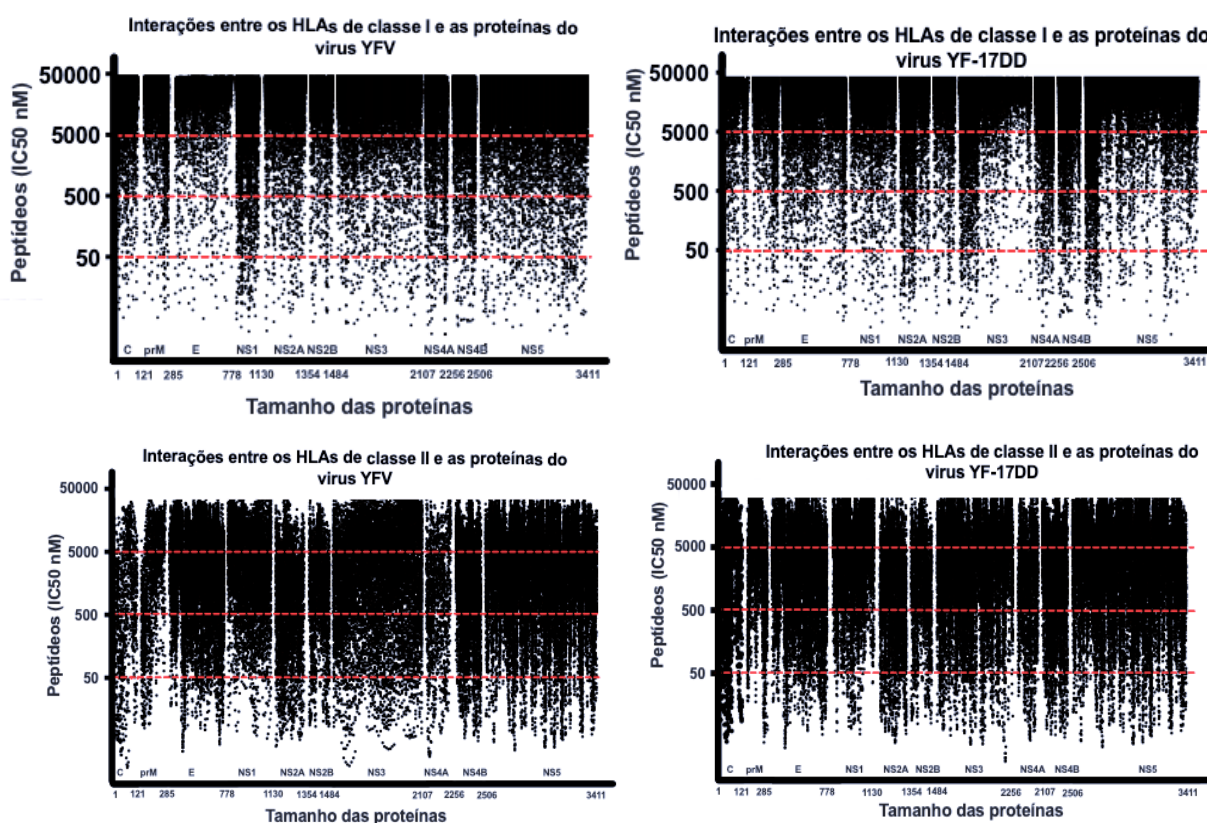
### **3.7 Representação gráfica dos dados e análises estatísticas**

Os dados de interesse presentes na planilha gerada pela ferramenta da IEDB foram então exportados para o software GraphPad Prism v.9.2.0, (San Diego, CA, EUA) facilitando o agrupamento e visualização dos dados de predição em gráficos. Para as análises estatísticas foi usada correlação de Pearson (r) e correlação de Spearman (r) GraphPad Prism v.9.2.0.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Todas as proteínas do YFV e do YF-17DD tem peptídeos preditos capazes de interagir com os vinte e sete HLA de classes I e os vinte e sete de HLA de classes II mais prevalentes.

Para traçar uma dimensão da capacidade de diferentes HLAs em apresentar antígenos do YF-17DD e do YFV, utilizamos as ferramentas bioinformáticas disponibilizadas pela IEDB para prever peptídeos nas proteínas do YF-17DD e do YFV capazes de se ligar aos vinte e sete HLAs de classe I e aos vinte e sete HLAs de classe II mais prevalentes na população mundial. Na figura 8, podemos observar que todas as proteínas do YFV e do YF-17DD geraram muitos peptídeos que podem se ligar aos cinquenta e quatro HLAs mais prevalentes. A maioria das interações HLA-



**Figura 8.** Afinidade geral dos vinte e sete HLAs-I e dos vinte e sete HLAs-II mais prevalentes pela poliproteína do YFV e YF-17DD. Na coluna direita se mostram as interações dos HLAs de classe I (gráfico superior) e II (gráfico inferior) com a poliproteína do vírus YF-17DD e na parte esquerda se mostram as interações dos HLAs de classe I e II com a poliproteína do vírus YFV. Cada ponto representa uma interação HLA-peptídeo. O eixo X, representa a sequência de aminoácidos da poliproteína de cada vírus, e se mostra a posição das proteínas em cada poliproteína viral. As linhas pontilhadas indicam os valores de IC50.

peptídeo preditas apresentaram um IC50 maior que 500 nM, o que indica uma baixa afinidade e pouca probabilidade de formar uma ligação estável. Embora observemos uma imunogenicidade dispersa ao longo de toda a poliproteína viral, de forma interessante, a porção N-terminal das proteínas NS2A, NS3, e as porções N- e C-terminal da proteína NS5 do vírus atenuado parecem fazer muitas interações significativas com os HLAs de classe I superando as interações do vírus selvagem.

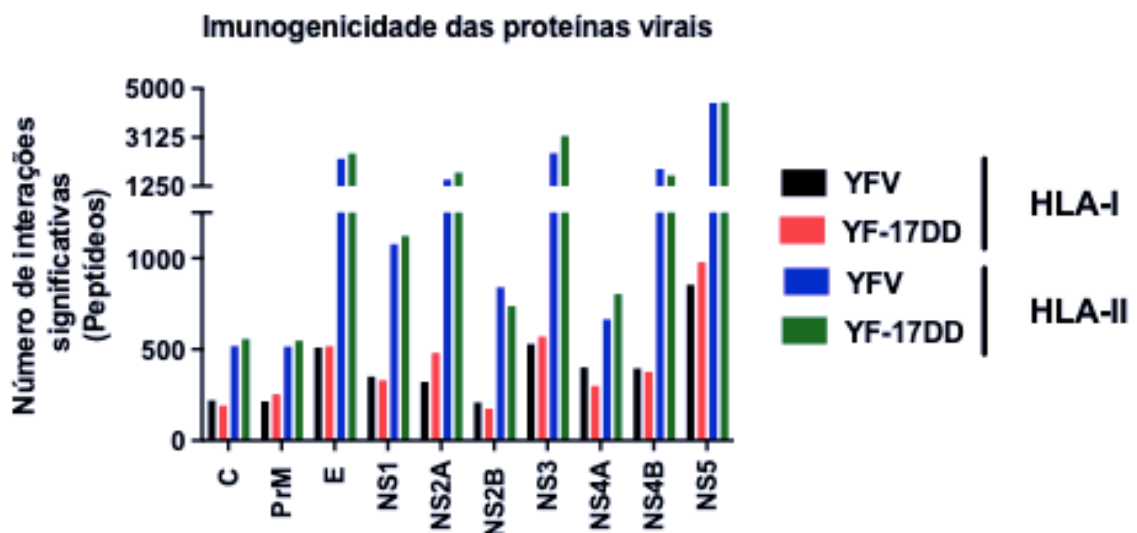
Em seguida, investigamos quais proteínas virais tem maior número de interações preditas com os HLAs mais prevalentes. Para isso, verificamos o número de interações dos HLA com cada proteína viral. Encontramos que as proteínas NS5, NS3, E, NS2A e NS1 foram as mais imunogênicas (proteínas com maior número de antígenos preditos) (tabela 2 e figura 9). Em contraste, as proteínas menos imunogênicas (proteínas com menor número de peptídeos preditos) foram as proteínas prM, C e NS4A (tabela 2 e figura 9). De forma curiosa, NS1 apresentou um número de interações muito próximo ou menor do que NS2A e NS4B, mesmo sendo uma proteína maior (tabela 2 e figura 9). Por outro lado, a proteína NS2A apresentou um número de interações muito próximo ao das proteínas E e NS3, mesmo essas proteínas possuindo respectivamente duas e três vezes o tamanho da proteína NS2A (tabela 2 e figura 9). Essas observações são mais pronunciadas nas interações com os HLAs de classe II, enquanto as interações dos HLAs de classe I com as proteínas do vírus selvagem mantem uma relação na qual o tamanho da proteína parece se associar ao número de interações (figura 9 e tabela 2).

Em geral, o número de interações HLA-peptídeo preditas entre os 27 HLA-I e os 27 HLA-II mais prevalentes e os peptídeos derivados das proteínas do YFV e do YF-17DD foram muito próximas, embora possamos observar que geralmente o vírus YF-17DD gera um pouco mais de peptídeos capazes de se ligar aos diferentes HLAs que o YFV. Por exemplo os HLAs de classe I apresentaram 33% a mais de interações com a proteína NS2A do vírus vacinal do que com o vírus selvagem (481 vs 322 interações) (tabela 2 e figura 9). Uma observação similar aconteceu com a proteína NS5 na qual os HLAs de classe I tiveram 12% a mais de interações com o vírus vacinal do que com o vírus selvagem (978 vs 855) (tabela 2 e figura 9). Em contraste, a proteína NS4A do vírus selvagem foi mais bem reconhecida pelos HLAs de classe I com 25% a mais de interações (402 vs 300) do que a do vírus vacinal (tabela 2 e figura 9). Já os HLAs de classe II tiveram maior número de interações com a proteína NS3

do vírus vacinal do que a NS3 e do vírus selvagem apresentando 21% a mais de interações HLA-peptídeo preditas (3182 vs 2519) (tabela 2 e figura 9). Por outro lado, a NS2B do YFV apresentou 13% a mais de interações que a NS2B do YF-17DD. De forma geral, embora a imunogenicidade predita de ambos os vírus seja próxima, o YF-17DD apresentou um pouco mais de interações com os HLAs de classe II. No total, foram 19942 interações preditas, entretanto o vírus selvagem, apresentou 18448 interações com os HLAs de classe II. Por outro lado, o vírus vacinal YF-17DD teve 4958 interações preditas com os HLAs de classe I e o vírus YFV 4576 HLAs de classe I. Tais observações sugerindo um ganho de imunogenicidade do vírus YF-17DD.

Proteínas (numero de aminoácidos)	< 50nM Alta afinidade				> 50 < 500 nM Afinidade intermediaria				Numero total de interações de afinidade significativa			
	YFV		YF-17DD		YFV		YF-17DD		YFV		YF-17DD	
	HLA-I	HLA-II	HLA-I	HLA-II	HLA-I	HLA-II	HLA-I	HLA-II	HLA-I	HLA-II	HLA-I	HLA-II
NS5 (905)	240	853	263	861	615	3591	715	3602	855	4444	978	4463
NS3 (623)	132	497	142	614	398	2022	426	2504	530	2519	571	3182
E (493)	112	352	124	401	388	1948	394	2103	511	2300	518	2504
NS2A (224)	84	332	139	382	238	1169	342	1393	322	1501	481	1775
NS4B (250)	72	282	83	304	325	1623	294	1359	397	1905	377	1663
NS1 (352)	66	150	24	127	286	927	304	995	352	1077	330	1122
NS4A (149)	87	145	76	131	315	521	224	673	402	666	300	804
NS2B (130)	51	142	51	144	159	698	124	594	210	840	175	738
C (121)	36	148	35	139	186	471	158	419	222	519	193	558
prM (164)	35	93	37	238	179	422	142	309	214	515	254	547

**Tabela 2. Interações das proteínas do YFV e o YF-17DD com os cinquenta e quatro HLAs mais prevalentes.** Se indica o tamanho (número de aminoácidos) e número de interações de cada proteínas do YFV e do YF-17DD com os HLAs de classe I e II mais prevalentes no mundo.



**Figura 9. Imunogenicidade das proteínas virais.** Número de interações significativas dos HLAs mais prevalentes com as proteínas do YFV e YF-17DD.

## 4.2 Existem HLAs com ampla e baixa capacidade predita para apresentar antígenos do YFV e do YF-17DD.

Após estes achados, nos perguntamos quais HLAs tem maior ou menor capacidade predita para interagir com peptídeos das proteínas do YFV e do YF-17DD. Para resolver esta questão previmos e contamos as interações significativas

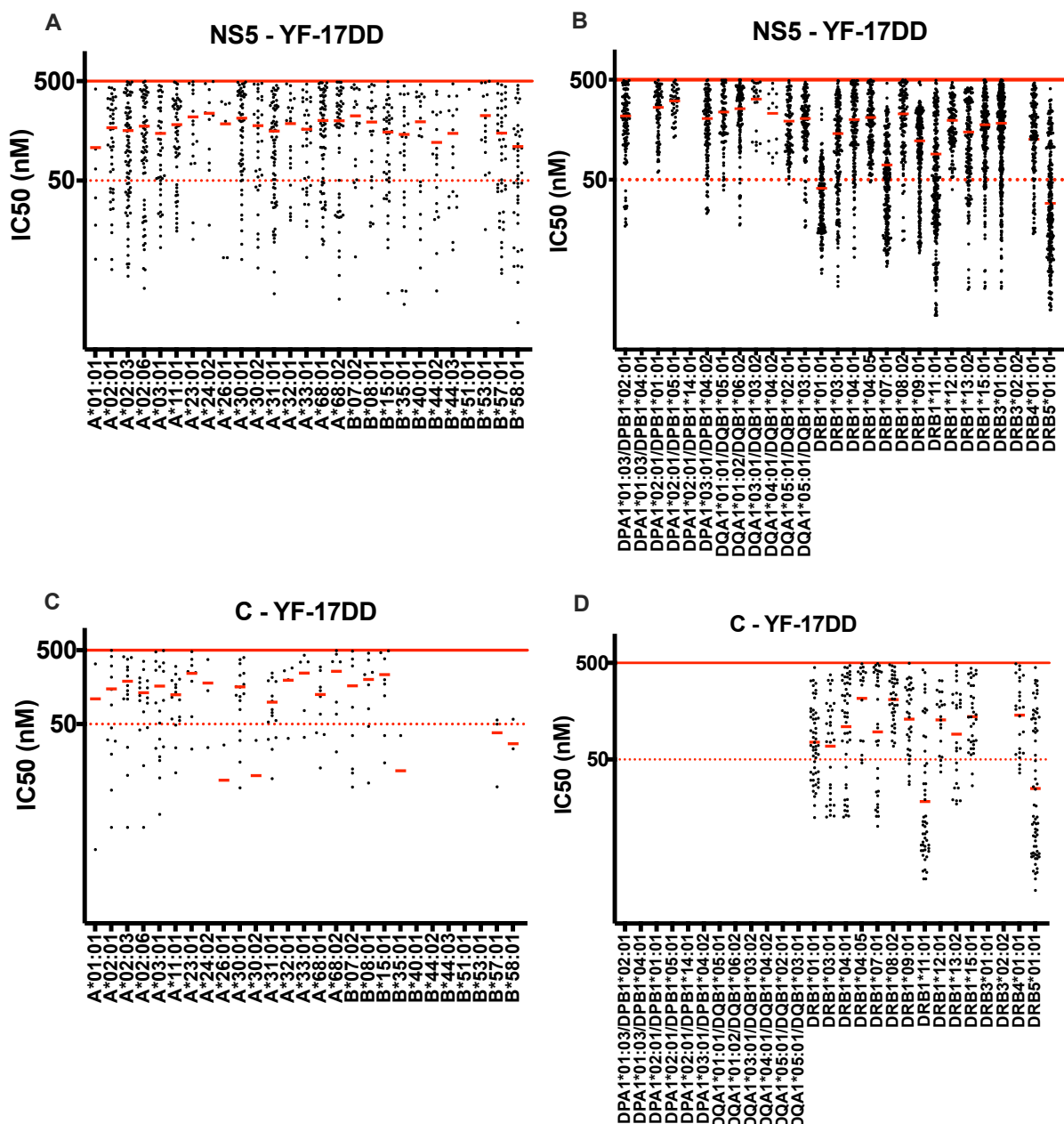


Figura 10. Interações significativas dos cinquenta e quatro HLAs mais prevalentes com peptídeos da proteína NS5 e da proteína C do YF-17DD. Na coluna da esquerda se mostram as interações dos HLA-I com a proteína NS5 e C e na direita se mostram as interações dos HLA de classe II. Cada ponto representa uma interação HLA-peptídeo. As linhas vermelhas horizontal indica a média de IC50 das diferentes interações HLA-peptídeo e as linhas pontilhadas indicam os valores de IC50.

(interações com IC50 <500) entre os cinquenta e quatro HLAs mais comuns da população mundial e os peptídeos preditos nas proteínas do YFV e YF-17DD. Como podemos observar nas figuras 10 e 11, alguns HLAs apresentam excelente capacidade predita de apresentação de peptídeos virais enquanto outros HLAs são péssimos apresentadores, tanto de antígenos de YFV quanto de YF-17DD. Por exemplo, se considerarmos a proteína NS5 e a proteína C que foram respectivamente as proteínas mais e menos imunogênica tanto para o YF-17DD quanto para o YFV, podemos observar que os HLA-I que apresentaram maior número de interações com a NS5 do vírus vacinal (YF-17DD) foram os HLA A\*02:03 (78 interações), A\*31:01 (69 interações), A\*02:06 (67 interações), A\*30:01 (57 interações) e A\*11:01 (58 interações) (figura 10A). Em contraste, os HLA-I que apresentaram menor número de interações com a NS5 do vírus vacinal foram os HLAs B\*51:01 (1 interações), A\*01:01 (7 interações), A\*26:01 (8 interações), B\*53:01 (6 interações) e A\*23:01 (16 interações) (figura 10A). Já os alelos de HLA de classe II que tiveram maior afinidade pela NS5 do YF-17DD foram os alelos HLAs DRB1\*01:01 (441 interações), DRB1\*11:01 (328 interações), DRB5\*01:01 (324 interações),

TABELA 3	Número de interações dos vinte e sete HLA-I mais prevalentes no mundo com as proteínas YF-17DD										Número de interações dos vinte e sete HLA-I mais prevalentes no mundo com as proteínas YFV									
	HLA-I	E	C	prM	NS1	N2A	NS2B	NS3	NS4A	NS4B	NS5	E	C	prM	NS1	NS2A	NS2B	NS3	NS4A	NS4B
A*02:03	69	14	19	14	81	30	67	42	54	78	77	14	21	19	47	30	66	47	58	76
A*02:06	60	16	21	18	73	30	56	37	47	67	62	16	21	21	42	25	53	42	43	67
A*02:01	39	12	7	9	67	20	41	34	40	43	43	12	10	13	36	17	40	36	42	42
B*15:01	38	8	11	14	40	13	34	31	27	43	49	7	14	16	29	14	26	29	25	49
A*68:02	42	7	14	19	30	13	29	26	23	49	33	8	9	27	34	9	32	34	23	43
A*68:01	36	10	10	23	22	6	41	9	11	67	23	18	30	16	7	28	28	7	12	42
A*31:01	17	15	13	19	26	5	45	5	16	69	17	19	9	24	9	6	37	10	10	67
A*30:01	18	17	16	23	13	1	33	8	11	57	27	27	17	18	8	0	28	7	12	56
A*03:01	24	18	33	13	12	4	26	6	14	43	9	15	11	14	6	0	44	6	18	69
A*11:01	23	16	3	17	14	3	32	7	13	58	22	15	3	17	8	3	31	8	17	52
B*58:01	19	2	4	17	12	3	13	11	17	41	39	6	6	15	6	2	10	6	8	45
B*35:01	11	1	11	9	15	8	20	17	14	26	20	3	4	17	10	3	12	10	15	41
B*07:02	10	8	8	11	7	7	26	10	12	21	9	1	10	10	15	6	19	15	15	26
B*57:01	11	3	7	13	7	2	10	7	6	45	8	10	8	7	10	7	22	10	12	18
A*33:01	6	5	4	10	12	7	19	3	4	33	3	5	5	8	3	12	18	4	12	33
A*23:01	9	9	5	11	10	2	7	9	11	16	11	8	4	16	10	0	7	10	5	16
B*08:01	11	8	6	4	6	1	11	4	11	25	3	1	7	11	6	3	11	6	8	31
A*32:01	14	4	2	12	1	0	11	3	12	21	12	4	0	8	4	0	11	4	10	21
A*30:02	6	1	7	9	3	2	9	4	5	32	3	8	5	4	4	0	11	4	10	23
B*40:01	9	0	0	15	8	4	6	5	3	19	10	0	0	13	6	5	4	6	3	19
B*44:02	9	0	2	11	6	5	8	2	6	19	7	1	2	9	2	5	9	2	5	19
B*44:03	11	0	0	12	6	6	7	3	6	17	7	0	0	10	3	6	6	3	6	17
A*24:02	3	4	4	8	7	0	6	4	1	11	6	2	0	3	1	0	18	1	2	6
A*26:01	7	1	0	2	2	2	5	4	3	8	1	3	3	15	6	0	7	6	2	11
B*53:01	3	0	1	3	2	1	0	1	7	6	6	1	1	0	4	2	5	4	3	6
A*01:01	3	2	2	4	0	0	1	1	1	7	1	0	0	0	0	0	6	0	0	1
B*51:01	2	0	0	0	3	0	7	2	1	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Tabela 3. Interações significativas dos vinte e sete HLA-I mais prevalentes na população mundial com peptídeos das proteínas do YF-17DD e do YFV.

DQA1\*05:01/DQB1\*03:01 (295 interações) e DRB1\*15:01 (279 interações) e, os alelos de HLA de classe II que menor número de interações tiveram com essa proteína foram os alelos HLA-DQA1\*04:01/DQB1\*04:02 (31 interações), DQA1\*03:01/DQB1\*03:02 (45 interações), DQA1\*03:01/DQB1\*03:02 (45 interações) e DRB3\*01:01 (84 interações), e os alelos HLA DPA1\*01:03/DPB1\*04:01, DPA1\*02:01/DPB1\*14:01 e DRB3\*02:02 não apresentaram nenhuma interação (figura 10B). A proteína C foi a proteína com menor número de interações significativas, os HLA-I que maior número de interações tiveram com essa proteína do YF-17DD foram os alelos A\*03:01 (18 interações), A\*30:01 (17 interações), A\*02:01 (12 interações), A\*02:06 (16 interações), A\*31:01 (15 interações). Os HLA-I que menor número de interações tiveram com a proteína C do YF-17DD foram A\*01:01 (3 interações), A\*24:02 (4 interações), A\*26:01 (1 interações), B\*35:01 (1 interações), A\*32:01 (4 interações) e os alelos B\*40:01, B\*44:02, B\*44:03, B\*51:01 e B\*53:01 não tiveram nenhuma interação (figura 10C). Os HLAs de classe II que tiveram maior número de interações com a proteína C do YF-17DD foram os alelos HLA-DRB5\*01:01 (62 interações), DRB1\*01:01 (72 interações) e DRB1\*11:01 (61

TABELA 4	Número de interações dos vinte e sete HLA-II mais prevalentes no mundo com as proteínas YF-17DD										Número de interações dos vinte e sete HLA-II mais prevalentes no mundo com as proteínas YFV									
	HLA-II	E	C	prM	NS1	N2A	NS2B	NS3	NS4A	NS4B	NS5	E	C	prM	NS1	N2A	NS2B	NS3	NS4A	NS4B
DRB1*01:01	254	72	55	90	197	85	342	107	193	441	154	54	55	89	166	84	332	108	198	439
DQA1*05:01/DQB1*03:01	249	0	17	60	128	78	297	0	142	295	248	0	19	56	101	77	172	0	150	298
DRB1*07:01	139	41	53	78	118	34	217	60	124	275	172	0	24	45	147	55	168	0	248	231
DQA1*01:02/DQB1*06:02	173	0	24	47	137	55	182	0	244	201	139	32	53	68	104	32	215	37	134	274
DRB5*01:01	146	62	70	47	62	26	204	50	64	324	140	67	69	48	60	25	192	35	71	348
DRB1*11:01	134	61	55	47	99	18	155	62	68	328	133	50	55	47	85	23	150	40	75	330
DRB1*09:01	123	40	65	50	106	49	189	73	121	196	117	34	21	42	130	31	171	31	139	270
DRB1*15:01	117	43	23	42	132	30	183	33	129	279	123	33	65	46	110	47	176	48	123	200
DRB4*01:01	133	38	0	44	90	45	143	39	78	221	70	0	17	39	124	57	148	0	79	285
DRB1*04:05	114	35	22	47	96	34	121	10	73	225	134	1	0	42	87	48	142	34	76	239
DRB1*04:01	133	19	18	43	99	27	137	9	79	135	114	46	18	43	89	27	131	52	75	136
DPA1*02:01/DPB1*01:01	71	0	17	39	114	0	150	0	74	220	124	17	22	47	82	40	112	55	70	136
DPA1*03:01/DPB1*04:02	75	0	25	32	136	44	56	0	80	165	75	0	25	32	236	47	62	0	81	121
DRB1*13:02	63	24	37	28	25	7	148	28	73	136	71	31	26	96	28	7	112	27	21	169
DRB1*08:02	64	36	21	12	35	7	100	22	130	137	62	26	36	29	17	7	140	27	64	152
DRB1*03:01	73	31	26	96	23	7	114	37	24	116	64	36	21	11	39	5	90	13	134	111
DPA1*01:03/DPB1*02:01	49	0	17	50	67	29	61	0	49	166	44	0	17	48	65	36	56	0	51	142
DRB3*01:01	59	0	18	47	5	0	72	25	104	84	59	0	18	48	3	0	70	15	101	85
DQA1*05:01/DQB1*02:01	56	0	7	48	23	23	53	0	19	116	57	0	7	48	22	27	49	0	0	115
DQA1*03:01/DQB1*03:02	37	0	4	67	6	21	45	0	22	45	37	0	3	67	6	21	23	0	22	39
DQA1*01:01/DQB1*05:01	21	0	7	40	14	11	36	0	23	76	20	0	7	35	9	10	26	0	21	86
DRB1*12:01	0	22	12	0	0	0	0	76	0	102	38	0	6	32	18	16	27	0	11	33
DPA1*02:01/DPB1*05:01	18	0	8	17	7	59	26	0	9	56	0	20	13	0	0	0	0	0	0	102
DQA1*04:01/DQB1*04:02	36	0	6	42	18	15	37	0	10	31	13	0	8	8	5	6	26	0	11	40
DPA1*02:01/DPB1*14:01	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DPA1*01:03/DPB1*04:01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DRB3*02:02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 4. Interações significativas dos vinte e sete HLA-II mais prevalentes na população mundial com peptídeos das proteínas do YF-17DD e do YFV.

interações). Já os alelos de HLA de classe II que apresentaram menor número de interações com a proteína C do YF-17DD foram os HLAs DRB1\*15:01 (43 interações) DRB1\*12:01 (22 interações), DRB1\*04:05 (35 interações) e os alelos DQA1\*05:01/DQB1\*03:01, DQA1\*01:02/DQB1\*05:02, DPA1\*02:01/DPB1\*01:01, DPA1\*03:01/DPB1\*02:01, DRB3\*01:01, DPA1\*03:01/DPB1\*03:02, DQA1\*01:01/DQB1\*05:01, DPA1\*02:01/DPB1\*05:01, DQA1\*04:01/DQB1\*04:02, DPA1\*02:01/DPB1\*14:01, DPA1\*01:03/DPB1\*04:01 e DRB3\*02:02 não apresentaram nenhuma interação com a proteína C do YF-17DD (figura 10D).

De forma geral, os HLA de classe I ou de classe II com ampla ou baixa capacidade para apresentar peptídeos derivados de proteínas estruturais foram os mesmo que apresentaram alta ou baixa capacidade para ligar antígenos de proteínas não estruturais tanto do vírus vacinal como do vírus selvagem solo com algumas alterações na ordem (figura 10 e tabelas 3 e 4).

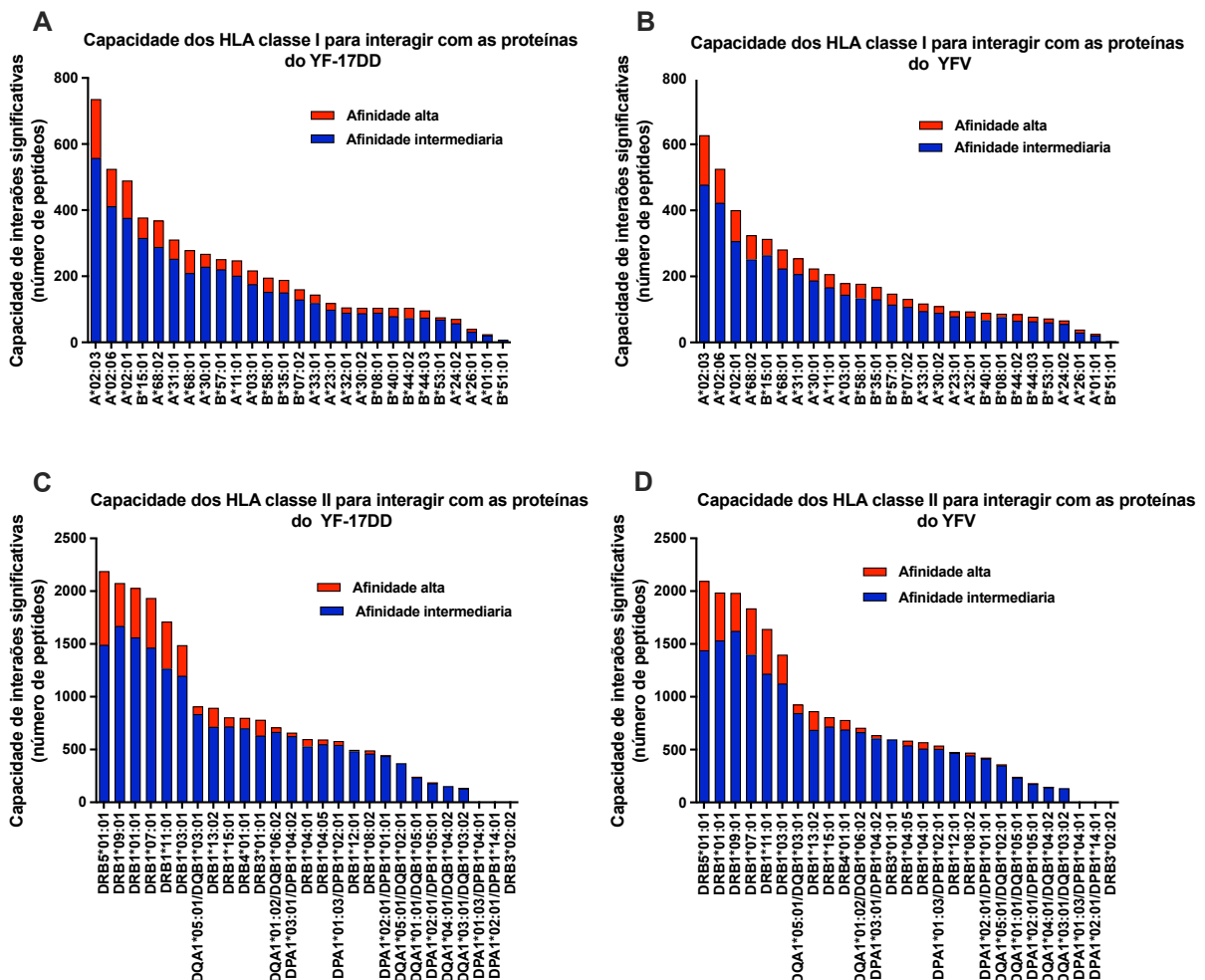
### **4.3 Desenvolvimento do score para classificar HLAs de acordo a sua capacidade para ligar antígenos do YF-17DD e do YFV**

Em seguida nos perguntamos quais HLAs tem maior e menor capacidade geral predita para apresentar antígenos do YFV e do YF-17DD. Para abordar essa questão, criamos um *score* para cada alelo de HLA-I e HLA-II em função do número de interações (HLA-peptídeo) significativas (interações com IC50 <500 nM). Na figura 11 podemos observar claramente que há alelos com ótima capacidade de interação sendo capazes de apresentar muitos peptídeos preditos, mas também há alelos com capacidade muito ruim para estabelecer interações significativas com as proteínas virais. Por exemplo os alelos de HLA da classe I HLA-A\*02:03 > A\*02:06 > A\*02:01 > B\*15:01 > A\*68:02, A\*31:01 > A\*68:01 > A\*30:01 > B\*57:01 > A\*11:01 foram os que tiveram maior capacidade para interagir com peptídeos de proteínas do vírus vacinal (figura 11A). Esses mesmos alelos foram os melhores apresentadores de antígenos do vírus selvagem, mas em ordem um pouco diferente: HLA-A\*02:03 > A\*02:06 > A\*02:01 > A\*68:02 > B\*15:01 > A\*68:01 > A\*31:01 > A\*30:01 > A\*11:01 > A\*03:01 (Figura 11B). De forma oposta os alelos de HLAs de classe I que apresentaram menor número interação com o YF-17DD foram HLA-B\*51:01 < A\*01:01 < A\*26:01 < A\*24:02 < B\*53:01 < B\*44:03 < B\*44:02 < B\*40:01 < B\*08:01 < A\*30:02 (figura 11A). Esses



HLAs também foram encontrados dentre os piores apresentadores de peptídeos preditos do YFV que foram: HLA-B\*51:01 < A\*01:01 < A\*26:01 < A\*24:02 < B\*53:01 < B\*44:03 < B\*44:02 < B\*08:01 < B\*40:01 < A\*32:01 (figura 11B).

Os HLAs de classe II com maior número de interações com as proteínas do YF-17DD foram HLA-DRB5\*01:01 > DRB1\*09:01 > DRB1\*01:01 > DRB1\*07:01 > DRB1\*11:01 > DRB1\*03:01 > DQA1\*05:01/DQB1\*03:01 > DRB1\*13:02 > DRB1\*15:01 > DRB4\*01:01 (figura 11C), que também foram os mesmos alelos de HLAs de classe II com maior número de interações com proteínas do YFV com apenas pequenas mudanças na ordem: HLA-DRB5\*01:01 > DRB1\*01:01 > DRB1\*09:01 > DRB1\*07:01 > DRB1\*11:01 > DRB1\*03:01 > DQA1\*05:01/DQB1\*03:01 > DRB1\*13:02 > DRB1\*15:01 > DRB4\*01:01 (figura 11D).



**Figura 11. Score da capacidade dos HLAs de classe I e II mais prevalentes para interagir com as proteínas do YF-17DD e do YFV.** Número de interações entre os HLAs de classe I com as proteínas dos vírus YF-17DD e YFV (A e B). Número de interações entre os HLAs de classe II com as proteínas dos vírus YF-17DD e YFV (C e D).

Os alelos de HLAs de classe II que mostraram menor número de interações com peptídeos das proteínas do YF-17DD foram os HLA-DRB3\*02:02 < DPA1\*02:01/DPB1\*14:01 < DPA1\*01:03/DPB1\*04:01 < DQA1\*03:01/DQB1\*03:02 < DQA1\*04:01/DQB1\*04:02 < DPA1\*02:01/DPB1\*05:01 < DQA1\*01:01/DQB1\*05:01 < DQA1\*05:01/DQB1\*02:01 < DPA1\*02:01/DPB1\*01:01 < DRB1\*08:02 < DRB1\*12:01 (figura 11C). Esses alelos também são ruins apresentadores de peptídeos do YFV, apenas com a ordem diferentes: HLA-DRB3\*02:02 < DPA1\*02:01/DPB1\*14:01 < DPA1\*01:03/DPB1\*04:01 < DQA1\*03:01/DQB1\*03:02 < DQA1\*04:01/DQB1\*04:02 < DPA1\*02:01/DPB1\*05:01 < DQA1\*01:01/DQB1\*05:01 < DQA1\*05:01/DQB1\*02:01 < DPA1\*02:01/DPB1\*01:01 < DRB1\*08:02 < DRB1\*12:01 (figura 11D).

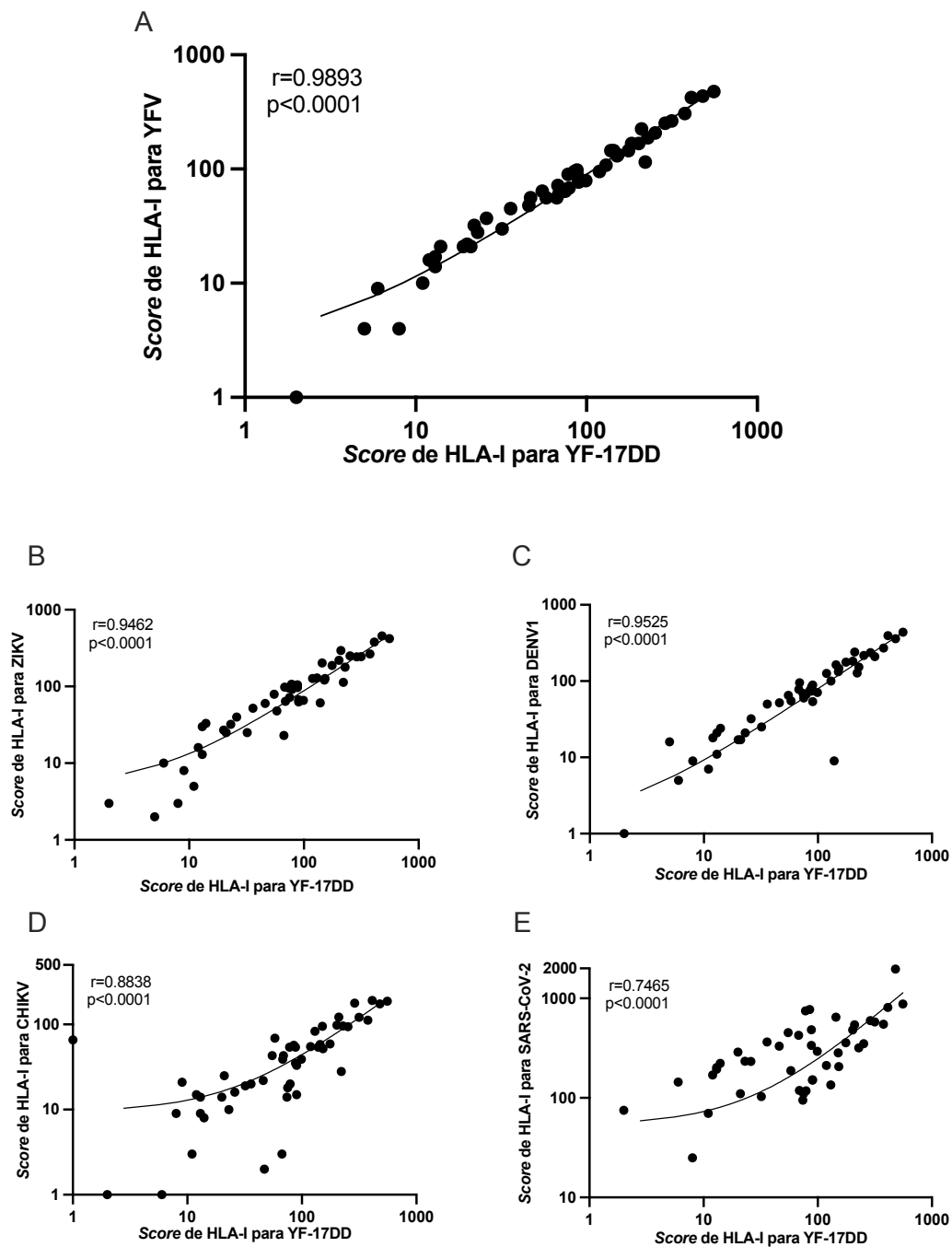
De forma geral, os alelos de HLA que apresentaram maior e menor número de interações entre o YFV e YF-17DD foram os mesmos, apenas com algumas pequenas alterações de ordem, provavelmente refletindo o alto nível de conservação entre os dois vírus com identidade de aa de 97,30% na poliproteína viral (figura 11).

#### **4.4 A capacidade de interação peptídeo-HLA do repertório de indivíduos com ampla ou pouca capacidade predita para interagir com antígenos do YF-17DD é espelhada para outros vírus.**

Após saber quais HLAs tem ótima ou péssima capacidade para interagir com antígenos do YF-17DD e YFV, investigamos se esses HLAs teriam muitas ou poucas interações com antígenos de outros *Flavivirus* e de vírus não filogeneticamente relacionados com o YF-17DD. Para isso, previmos as interações entre os oitenta e seis HLAs incluídos neste estudo e as proteínas do DENV1, ZIKV, CHIKV e SARS-CoV-2, e geramos o *score* da capacidade de interação de cada HLA com as proteínas desses vírus. Em seguida, comparamos os *scores* de interações preditas entre os HLAs e as proteínas do YF-17DD, e com as proteínas dos outros 5 vírus estudados para calcular a correlação entre eles (correlação de Pearson ( $r$ )). Como esperado, os *scores* preditos da capacidade dos alelos de HLA-I e HLA-II para interagir com antígenos do YF-17DD e do YFV apresenta uma forte correlação positiva ( $r=0.9934$  e  $r=0.9982$  para o *score* de HLA-I e HLA-II respectivamente), indicando que HLAs-I e HLAs-II com ampla ou baixa capacidade para interagir com antígenos do YF-17DD,

também tem ampla ou baixa capacidade para interagir com antígenos do YFV (figura 12A e 13A).

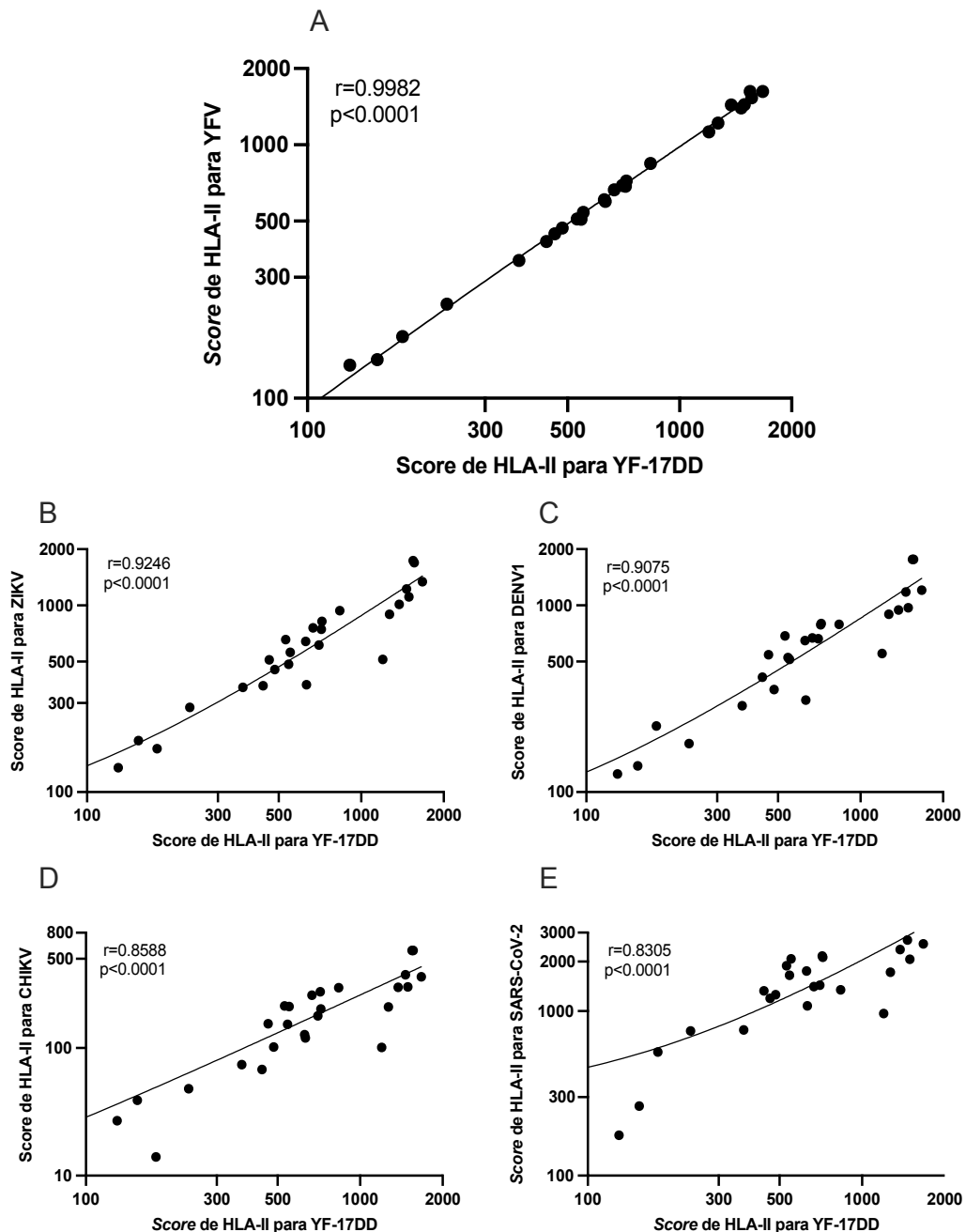
Interessantemente os alelos de HLA-I e HLA-II capazes de ter muitas ou poucas interações com os antígenos do YF-17DD também apresentaram muitas ou poucas interações com antígenos de outros *Flavivirus* como o ZIKV ( $r=0.9462$  e  $p<0.0001$  para



**Figura 12. Comparação do score da capacidade dos HLAs-I para interagir com antígenos do YF-17DD e de outros vírus.** Correlação da capacidade dos HLA-I para interagir com antígenos do YF-17DD e de outros *Flavivirus* YFV (A), ZIKV (B), DENV1 (C) e de vírus não filogeneticamente relacionados CHIKV (D) e o SARS-CoV-2 (E). No eixo X se mostra o score da capacidade dos HLA-I para ligar antígenos do YF-17DD e no eixo Y o score da capacidade dos HLA-I para interagir com antígenos de qualquer vírus estudados.

o score de HLA-I e HLA-II respectivamente) (figura 12B e figura 13B) e o DENV1 ( $r=9525$  e  $r=9075$  para o score de HLA-I e HLA-II respectivamente) (figura 12C e 13C).

Curiosamente alelos de HLAs-I e HLAs-II com ótima ou péssima capacidade para interagir com os antígenos do YF-17DD, apresentaram boa ou péssima capacidade para estabelecer interações com antígenos de vírus não relacionados

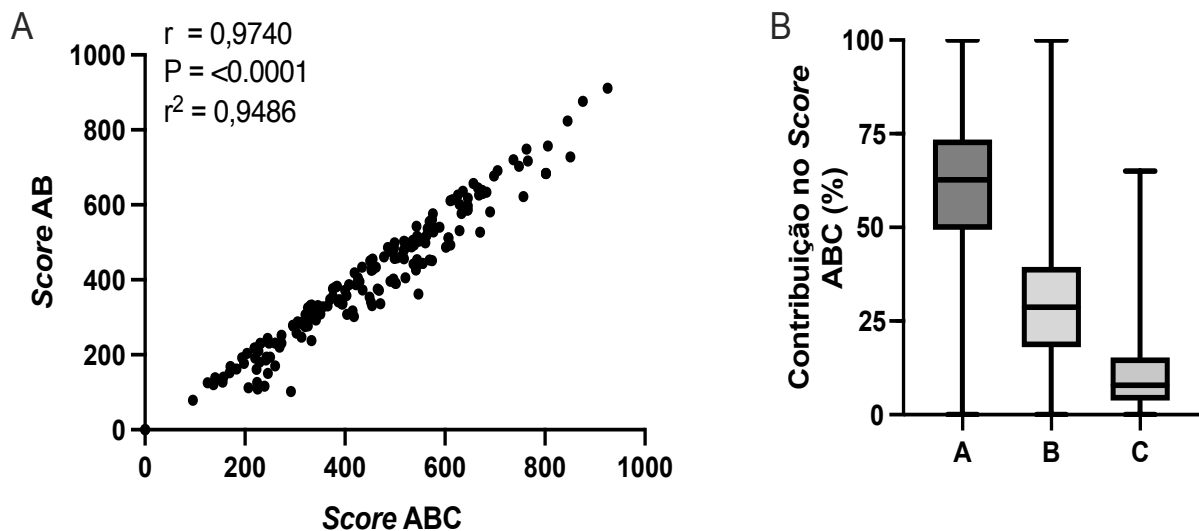


**Figura 13. Comparação do score da capacidade dos alelos de HLA-II para interagir com antígenos do YF-17DD e de outros vírus.** Correlação da capacidade dos alelos de HLA-II para interagir com antígenos do YF-17DD e de outros *Flavivirus* como o YFV (A), ZIKV (B), DENV1 (C), e de vírus não filogeneticamente relacionados CHIKV (D) e o SARS-CoV-2 (E). No eixo X se mostra o score da capacidade dos alelos de HLA-II para apresentar antígenos do YF-17DD e no eixo Y o score da capacidade dos HLA-II para apresentar antígenos de qualquer vírus estudados.

filogeneticamente com o YF-17DD como o *Alphavirus* CHIKV ( $r=0.8838$  e  $r=0.8588$  para o *score* de HLAs- I e HLAs-II respectivamente) (figura 12D e 13D) e o *Betacoronavirus* SARS-CoV-2 ( $r=0.8092$  e  $r=0.8305$  para o *score* de HLAs-I e HLAs II respectivamente) (figura 12E e 13E). Estas observações sugerem que HLAs-I e II com ampla ou péssima capacidade para interagir com antígenos do YF-17DD, também podem ter ampla ou péssima capacidade para interagir com antígenos do DENV1, do ZIKV, do CHIKV e do SARS-CoV-2. De forma geral, observamos que o *score* da capacidade de interações entre os HLAs-I e as proteínas do YF-17DD teve uma correlação parecida com os *scores* para *Flavivirus* como ZIKV e DENV1 ( $r=0.9462$  e  $r=0.9507$  respectivamente) (figura 12B e C). Por outro lado, a correlação do *score* dos HLAs-I para o YF-17DD foi maior com o *score* para o CHIKV que com o *score* para o SARS-CoV-2 ( $r=0.8838$  vs  $r=0.7465$ ) (figura 12D e E), assim como nos HLAs-I a correlação do *score* dos HLAs-II para o YF-17DD com o *score* para o CHIKV e o SARS-CoV-2 foi menor que a correlação com os *scores* para o ZIKV e DENV (figura 12E e 13E).

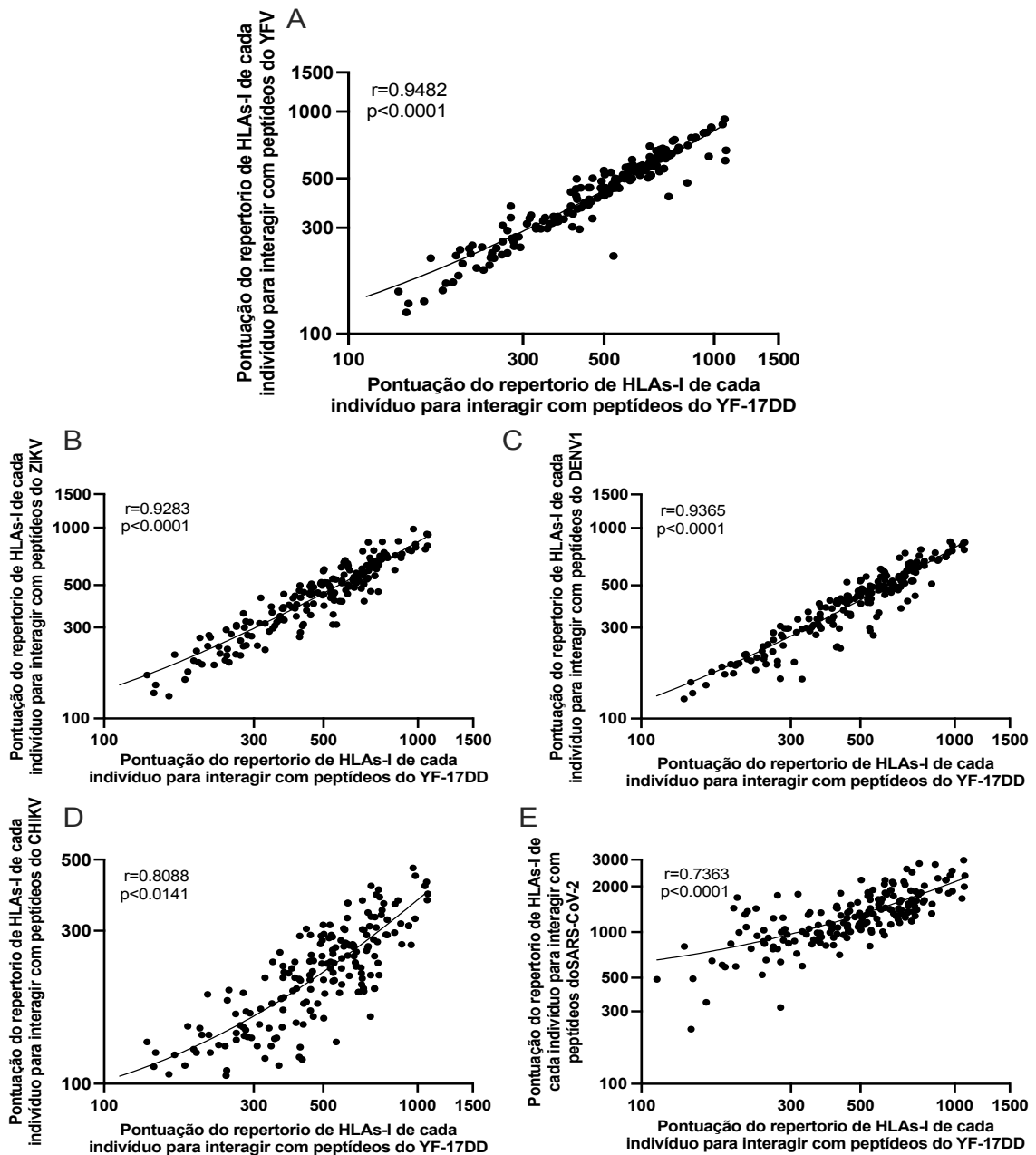
#### 4.5 Os HLAs A e B tem maior número de interações com as proteínas do YF-17DD do que os HLAs-C.

Resultados de nosso grupo tem mostrado que os HLA-C apresentam poucas interações com os antígenos do HCMV (De Almeida *et al*; dados não publicados);



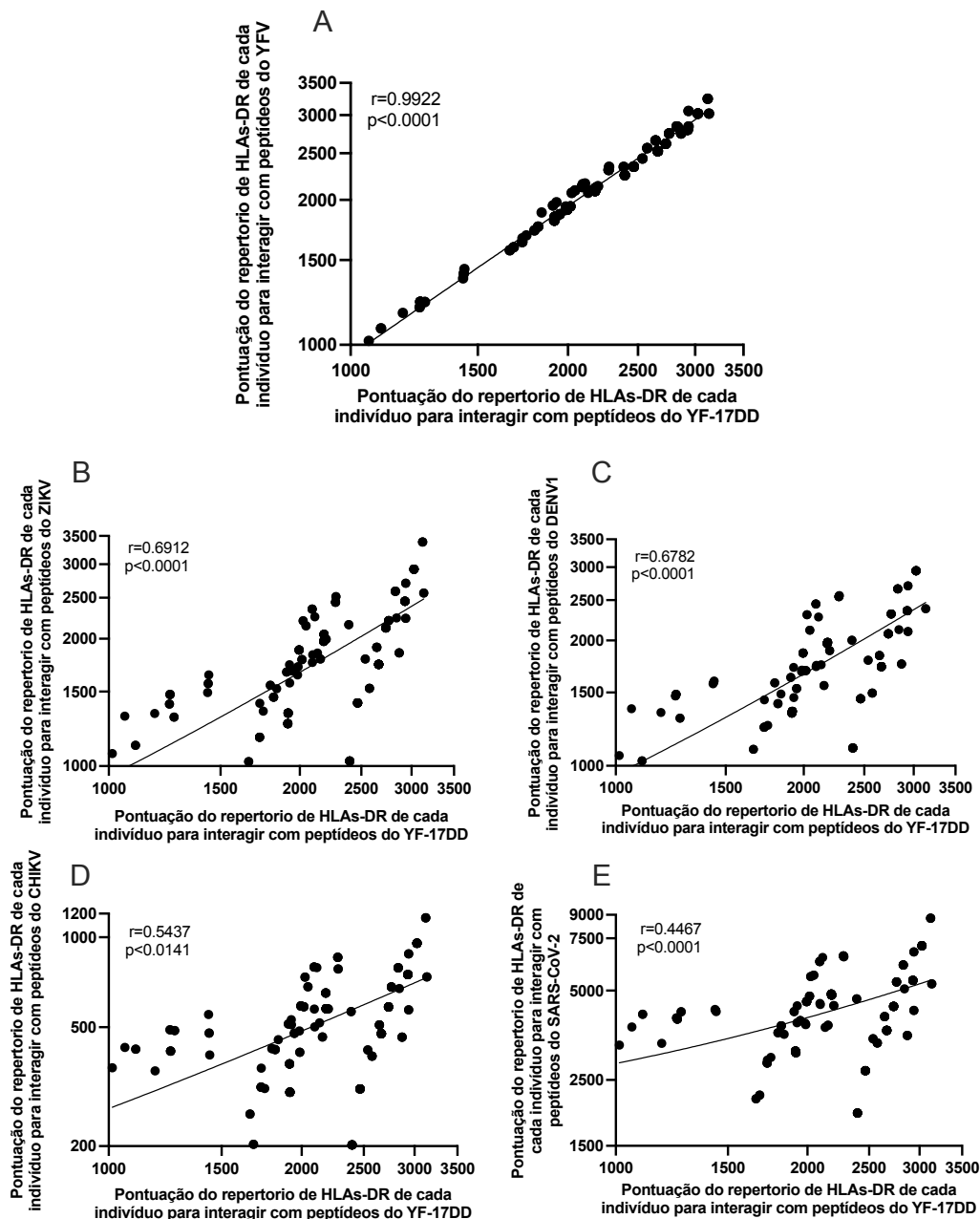
**Figura 14. Os HLAs A e B tem maior número de interações com as proteínas do YF-17DD do que os HLAs-C. A. Correlação do *score* AB com o *score* ABC B. Porcentagem da contribuição do *score* dos alelos A, B ou C no *score* total.**

diante desse achado, nos perguntamos se existem diferenças na capacidade dos alelos dos genes A, B e C para apresentar antígenos do YF-17DD. Para responder esta pergunta, comparamos os scores AB com os scores ABC, calculamos a correlação entre eles (Pearson  $r$ ) (figura 14A) e calculamos a porcentagem de contribuição do score C no score ABC (figura 14A). Encontramos que entre os scores



**Figura 15. Existem indivíduos com repertórios de HLA-I com ampla ou baixa capacidade predita para apresentar antígenos do YF-17DD e podem ter ampla ou baixa capacidade para apresentar antígenos de outros vírus.** Correlação da capacidade do repertório de HLA-I dos indivíduos estudados para apresentar antígenos do YF-17DD e de outros *Flavivirus* como o YFV (A), o DENV1 (B), o ZIKV (C) e de vírus não filogeneticamente relacionados como CHIKV (D) e SARS-CoV-2 (E). No eixo X se mostra a pontuação da capacidade do repertório de HLA-I de cada indivíduo para apresentar antígenos do YF-17DD e no eixo Y a capacidade do repertório de HLA-I de cada indivíduo para apresentar antígenos qualquer dos vírus estudados.

AB e ABC há uma correlação positiva forte ( $r=0,9740$ ) e que a porcentagem de contribuição do score C no score total (composto pela adição do score ABC) é menor do que 20%. Isto indica que o score dos alelos do gene C tem pouco aporte ao score total, sugerindo que os alelos do gene de HLA-C têm baixa capacidade para interagir com antígenos do YF-17DD (figura 14).



**Figura 16.** Existem indivíduos com repertórios de HLA-DR com ampla ou baixa capacidade predita para apresentar antígenos do YF-17DD e podem ter ampla ou baixa capacidade para apresentar antígenos de outros vírus. Correlação da capacidade do repertório de HLADR dos indivíduos estudados para apresentar antígenos do YF-17DD e de outros *Flavivirus* como o YFV (A), o DENV1 (B), o ZIKV (C) e de vírus não filogeneticamente relacionados como CHIKV (D) e SARS-CoV-2 (E). No eixo X se mostra a pontuação da capacidade do repertório de HLA-DR de cada indivíduo para apresentar antígenos do YF-17DD e no eixo Y a capacidade do repertório de HLA-DR de cada indivíduo para apresentar antígenos qualquer dos vírus estudados.

Posteriormente ao desenvolvimento do *score* da capacidade de cada HLA para interagir com os antígenos dos vírus estudados, aplicamos o *score* no repertório de HLA-I de 192 indivíduos e no repertório de HLAs-DR de 200 indivíduos. Todos os indivíduos pertencem a uma corte de doadores de órgãos, de pacientes com transplante ou na fila de transplante no Hospital Felício Rocho.

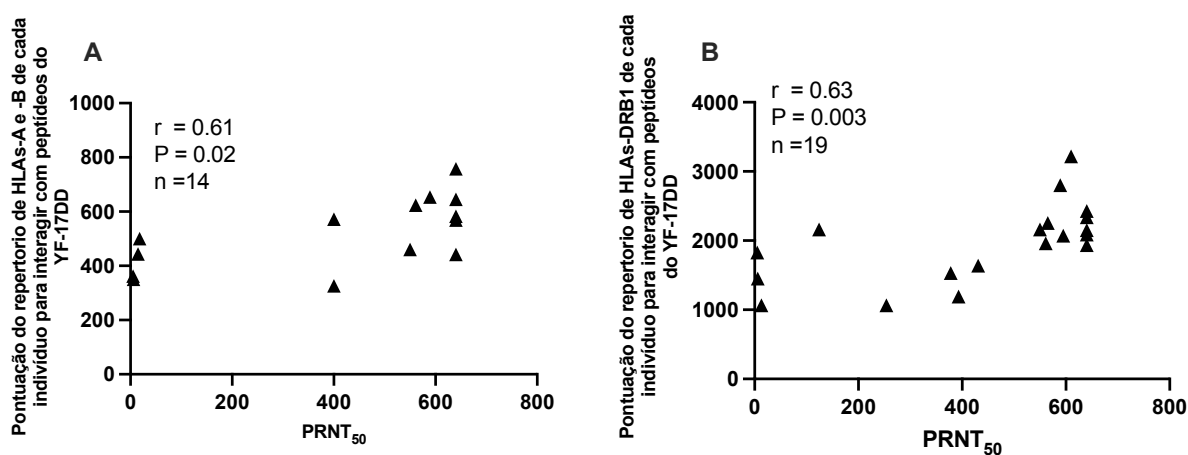
Para a aplicação do *score* no repertório de HLAs de cada doador de órgão, paciente transplantado ou na fila de transplante, somamos os valores do *score* de cada alelo de HLA presente no repertório de cada paciente, e dessa forma, conseguimos pontuar o repertório de HLAs de cada indivíduo de acordo com a sua capacidade predita para apresentar antígenos (tabela 1) dos vírus estudados. Como mostrado nas figuras 15A e 16A, podemos observar claramente que há indivíduos com pontuações altas e outros com pontuações baixas, isso indica respectivamente, que seus repertórios de HLAs tem ótima ou péssima capacidade predita para apresentar antígenos do YF-17DD. Indivíduos com pontuações mais altas tem seus repertórios de HLAs compostos por alelos que fazem alto número de interações com proteínas do YF-17DD, em contraste, indivíduos com pontuações baixas tem seu repertório de HLAs composto por alelos com baixa capacidade para interagir com antígenos do YF-17DD. Além disso, também podemos notar que indivíduos com alta ou baixa capacidade predita para apresentar antígenos do YF-17DD, também tem alta ou baixa capacidade predita para apresentar antígenos de outro vírus como o YFV, ZIKV, DENV1, CHIKV e SARS-CoV-2 (figura 15 e 16).

#### **4.6 Indivíduos com repertórios de HLA A, B e DRB1 capazes de fazer alto número de interações com as proteínas do YF-17DD apresentam alto título de anticorpos neutralizantes contra o YF-17DD após vacinação.**

Para testar a pontuação predita da capacidade de apresentação de antígenos de cada indivíduo, tipificamos o repertório de HLAs-I e II de uma coorte vacinal contra YF. Após saber quais são os alelos do repertório de HLAs-I e II dos indivíduos com baixa ou alta resposta vacinal (avaliada pela presença de anticorpos neutralizantes anti-YF-17DD 28 dias após vacinação), previmos a pontuação da capacidade de apresentação de antígenos para o repertório de HLA-A e B de 14 indivíduos e o repertório de HLA-DRB1 para 19 indivíduos. Em seguida calculamos a correlação entre as pontuações



de cada indivíduo e os valores do título de anticorpo neutralizantes anti-YF-17DD. Como observado na figura 17, encontramos que indivíduos com alta pontuação predita para apresentar antígeno do YF-17DD, apresentaram um maior título de anticorpo neutralizantes anti-YF-17DD (PRNT50). Em contraste, indivíduos com menor pontuação apresentaram menor título de anticorpo neutralizantes anti-YF-17DD (PRNT50). Isso nos sugere que a produção de anticorpos neutralizantes contra o YF-17DD após vacinação, está influenciada pela capacidade do repertório de HLA-DRB1 e HLA-A e -B de um indivíduo para apresentar antígenos do YF-17DD (figura 17).



**Figura 17. Indivíduos com repertórios de HLAs A, B e DRB1 capazes de fazer alto ou baixo número de interações com as proteínas do YF-17DD apresentam maior ou menor título de anticorpos neutralizantes contra o YF-17DD após vacinação.** A. Correlação da pontuação da capacidade do repertório de HLA-A e B de cada pacientes com o valor do PRNT50 28 dias após vacinação com YF-17DD. B. Correlação da pontuação da capacidade do repertório de HLA-DRB1 de cada pacientes com o valor do PRNT50 28 dias após vacinação com YF-17DD. No eixo X se mostra os valores do PRNT50 e no eixo Y a pontuação da capacidade do repertório de HLAs de cada pacientes para apresentar antígenos de qualquer do YF-17D.

## 5. DISCUSSÃO

O sistema imunológico protege o hospedeiro de patógenos invasores e a capacidade de reconhecimento dos componentes do patógeno é a chave para exercer a proteção imunológica. Os linfócitos T, que efetivamente orquestram a resposta imune geral, são específicos para ligantes peptídicos estranhos gerados intracelularmente pela degradação proteolítica de antígenos. Os peptídeos antigênicos gerados intracelularmente devem interagir com as moléculas do HLA para depois serem apresentados na superfície das APCs. Embora outros eventos também estejam envolvidos no processamento e apresentação de antígenos, o evento mais seletivo é o da ligação do HLA ao peptídeo antigênico. A ligação HLA-peptídeo é determinada pelas aa variáveis que compõem o assoalho e as paredes da fenda de ligação de cada alelo de HLA ao peptídeo antigênico. Devido à variabilidade de aa na fenda de ligação ao peptídeo, diferentes alelos de HLA tem diferente capacidade para ligar e exibem diversos peptídeos para serem reconhecidas pelos receptores antigênicos de diferentes linfócitos T. Este processo de seleção de epítomos de linfócitos T mediado por HLA, acaba sendo grandemente diversificado devido à natureza poligênica e polimórfica do HLA. Isso afeta significativamente a especificidade de ligação dos HLAs que estão disponíveis no repertório de cada indivíduo aos de peptídeos antigênico, algo que efetivamente, individualiza nossas respostas imunológicas.

O vírus YF-17DD usado como vacina contra a YF é uma vacina segura e considerada como um dos imunizantes mais bem sucedidos em toda a história da vacinologia (FERREIRA et al., 2018). A presença de anticorpos neutralizantes em indivíduos vacinados com o YF-17D está relacionada com proteção contra a YF (POLAND et al., 1981; WIETEN et al., 2016), embora outros mecanismos efetores das respostas imunes estejam envolvidos na proteção induzida pela vacina. As respostas dos linfócitos T são conhecidas por desempenhar um importante papel na modulação da produção de anticorpos e na morte de células infectadas pelo patógeno, e seu papel na resposta protetora induzida pela vacina contra a YF tem sido amplamente relatada (AKONDY et al., 2009; DE MELO et al., 2013; FERREIRA et al., 2018; MATEUS et al., 2020; NIEDRIG et al., 1999; POLAND et al., 1981; STRYHN et al., 2020; WIETEN et al., 2016).

A capacidade do YF-17DD em induzir uma resposta imune humoral e celular eficiente na proteção contra a YF, fazem desta vacina um excelente modelo para estudar a resposta do hospedeiro durante uma infecção viral aguda. Apesar da sua grande capacidade para estimular o sistema imune, uma pequena porção de indivíduos vacinados (de 2 a 8%) não conseguem desenvolver uma resposta imune protetora contra a YF (BARRETT, 2017; GÓMEZ; OCAZONEZ, 2008; GROOT; RIBERIRO, 1962). A particular capacidade do YF-17D em estimular o sistema imunológico sugere que a baixa porcentagem de falha vacinal esteja relacionada a fatores intrínsecos do hospedeiro, e não a fatores próprios da vacina.

Aqui, levantamos a hipótese de que os casos de falha vacinal contra a YF ocorrem em indivíduos com repertório de HLA composto por alelos incapazes de apresentar eficientemente os antígenos do YF-17D. Acreditamos que conhecer as interações entre os HLA-I e HLA-II com as proteínas do YF-17DD pode nos ajudar a entender melhor os casos de falha vacinal e a desenhar melhores estratégias de imunização contra a YF. Para testar nossa hipótese, usamos métodos bioinformáticos baseado em redes neurais artificiais para prever as interações dos antígenos do YF-17DD e do YFV mais propensos a se ligarem nos alelos de HLA estudados aqui, e usamos essa informação para criar um *score* para classificar os HLA segundo sua capacidade para interagir com epítomos do YFV e do YF-17DD. Posteriormente utilizamos o *score* de cada alelo de HLA para pontuar o repertório de HLA-I e HLA-II de indivíduos imunizados com a vacina YF-17DD, e correlacionamos a pontuação de cada paciente com sua capacidade para produzir anticorpos neutralizantes contra o YF-17DD 28 dias após a vacinação.

A nossa abordagem iniciou com a análise da imunogenicidade do YFV e do YF-17DD. Encontramos que as proteínas mais imunogênicas do YF-17DD foram as proteínas NS5, E, NS3, NS2A e NSS4B. Anteriormente foi mostrado que várias proteínas do YFV apresenta vários peptídeos imunogênicos, no entanto, algumas proteínas apresentam maior densidade antigênica (DE MELO et al., 2013; HAHN et al., 1987; MARY DAWN T. CO, 2002; STRYHN et al., 2020). Além da imunogenicidade conservada do YFV, durante sua atenuação, o YF-17DD sofreu alterações devido a algumas substituições de aa em sua sequência peptídica que puderam ter-lhe conferido maior imunogenicidade. Análises comparativas do proteoma do YFV e YF-17DD mostraram que essas alterações ocorreram nas proteínas E, NS2A, NS2B, NS3

e NS5 (nas regiões N- e C-terminal) (HAHN et al., 1987), o que pode justificar nosso achado de que as proteínas NS5, E, NS3 e NS2A foram as mais imunogênicas. Um outro estudo mostrou que linfócitos T CD4<sup>+</sup> isolados de indivíduos vacinados com o YF-17DD respondem a peptídeos derivados principalmente das proteínas E, NS3 e NS5 (JAMES et al., 2013), mas estas proteínas também são as maiores. No entanto, muitos peptídeos derivados das proteínas E, C, NS2A e NS3 do YF-17DD foram capazes de reestimar linfócitos T CD4<sup>+</sup> de indivíduos vacinados, mostrando que essas proteínas têm alta densidades de epítomos (JAMES et al., 2013). Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que a proteína NS2A tem uma imunogenicidade maior ou igual às proteínas NS3 e NS1, mesmo essas proteínas possuam respectivamente quase duas e três vezes o tamanho da proteína NS2A, resultados alinhados aos nossos achados. Por outro lado, Stryhn e colaboradores num trabalho que analisou o proteoma do YF-17DD mostraram que as proteínas E, NS1, NS2A, NS3 e NS5 apresentam muitos peptídeos capazes de interagir com HLA-II e foram hábeis para reestimar a produção de IFN $\gamma$  por linfócitos T isolados de indivíduos vacinados contra a YF (STRYHN et al., 2020). Interessantemente, eles observaram que as proteínas E, NS1, NS2A, NS3 e NS5 geram peptídeos que fazem muitas interações com os HLA-I, e reestimulam as respostas de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (STRYHN et al., 2020). De Melo e colaboradores encontraram que antígenos localizados nas proteínas E, NS1 e NS5 são capazes de deflagrar respostas nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de indivíduos vacinados contra a YF (DE MELO et al., 2013). Todos esses achados coincidem com os resultados de nossa análise sugerindo que proteínas NS5, E, NS3 e NS2A do vírus vacinal são alvos importantes das respostas dos linfócitos T e responsáveis pela alta imunogenicidade do YF-17DD.

Uma ampla gama de epítomos do YF-17DD são capazes de estimular linfócitos T isolados de indivíduos vacinados com esse vírus. Diversos são os estudos que tem mostrados que esses peptídeos são apresentados aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> especificamente através das moléculas de HLA -A\*02:01, A\*11:01, A\*02:03, A\*02:06, A\*31:01, A\*68:01, A\*68:02, A\*30:01, B\*15:01, B\*57:01 e aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> através dos alelos de HLA-DRB5\*01:01, DRB1\*09:01, DRB1\*01:01, DRB1\*07:01, DRB1\*11:01, DRB1\*03:01, DRB1\*13:02, DRB1\*15:01, DRB4\*01:01 (DE MELO et al., 2013; LUND et al., 2011; MARY DAWN T. CO, 2002; MATEUS et al., 2020; STRYHN et al., 2020) assim como mostrado em nossa abordagem.

Nossos resultados mostraram que os HLAs-C são apresentadores menos eficazes de antígenos virais. A resposta de linfócitos T CD8+ restritos a HLA-C tem sido pouco relatada em estudos que mostram a imunogenicidade do YF-17DD; em vez disso, a maioria dos epítomos de linfócitos T CD8+ tem sido identificada como sendo restritas a HLA-A ou -B (MATEUS et al., 2020; STRYHN et al., 2020). Esses achados podem estar relacionados ao fato de o HLA-C ser menos polimórfico e ter menor capacidade para ligar antígenos quando comparado com os HLA-A e -B (APPS et al., 2015; BASHIROVA et al., 2006); algo que tem sido associado com respostas reduzidas de linfócitos T citotóxicos (APPS et al., 2015; BASHIROVA et al., 2006). A escassez de fortes respostas de linfócitos T CD8+ restritas ao HLA-C, pelo menos em uma infecção viral aguda como a provocada pelo YF-17DD, não parece se dever ao fato de o HLA-C ter sido negligenciado na literatura científica, senão que reflete um verdadeiro fenômeno biológico (STRYHN et al., 2020).

Por outro lado, tem sido relatado que a respostas de linfócitos T de indivíduos vacinados com YF-17DD é direcionada contra epítomos imunodominantes (LUND et al., 2011), e que esses epítomos são majoritariamente apresentados em moléculas de HLA-A (APPS et al., 2015; DE MELO et al., 2013; LUND et al., 2011; STRYHN et al., 2020). STRYHN e colaboradores, mostraram que a apresentação de peptídeos dominantes pelo HLA-A\*02:01, por exemplo, restringiu fortemente as respostas de linfócitos T a outros peptídeos apresentados nesse HLA e diminuindo o impacto inclusive da resposta a antígenos apresentados por outros alelos de HLA (STRYHN et al., 2020). Por outro, DE MELO e colaboradores observaram que a capacidade de resposta de linfócitos T frente a peptídeos imunodominantes do YF-17DD numa coorte de vacinados contra a YF, está relacionada com a prevalência de alelos HLA-II que podem apresentar esses antígenos do vírus vacinal. Esses achados sugerem que o repertório de HLA exerce mais influência na emergência de uma resposta imunodominante que a própria sequência peptídica e sugere que indivíduos com repertório de HLAs composto por alelos muito permissivos à apresentação de peptídeos, capazes de gerar imunodominância a um determinado patógeno (no caso do YF-17DD), teriam a capacidade de estimular uma ampla quantidade de clones de linfócitos T para combater o patógeno. Em contraste, indivíduos com repertórios de HLAs com baixa capacidade para ligar e apresentar antígenos, provavelmente não terá a capacidade de estimular uma quantidade adequada de clones de linfócitos T

para combaterem o patógeno e estimular os linfócitos B. Esse fenômeno biológico apoia nossa hipótese de que casos de falha vacinal contra a YF ocorrem em indivíduos com repertório de HLA composto por alelos incapazes de apresentar eficientemente os antígenos do YF-17DD.

Nossos resultados mostraram que os HLA-II tem maior número de interações com os antígenos do YF-17DD. Esses resultados podem ser justificados porque os HLA-II tem extraordinária capacidade para apresentar uma ampla quantidade de peptídeos lineares devido à natureza de sua ligação ao antígeno. Além disso, normalmente os peptídeos exibidos nos HLAs-II apresentam uma natureza de ligação promíscua, ou seja, podem interagir com muitos alelos de HLA-II distintos. Com tudo, linfócitos T CD4+ são capazes de reconhecer uma diversidade maior de sequências de epítomos alvos do que os linfócitos T CD8+ (DE MELO et al., 2013; STRYHN et al., 2020). Isso pode representar um mecanismo de diversificação biologicamente significativo das respostas dos linfócitos T CD4+, uma vez que os linfócitos T CD4+ desempenham um papel importante na geração de respostas de linfócitos T citotóxicos, e na maturação da afinidade de anticorpos neutralizantes, e na manutenção da memória imunológica (SUN; WILLIAMS; BEVAN, 2004; ZAJAC et al., 1998). Neste contexto uma ampla capacidade de reconhecimento de antígenos pode reduzir o risco de escape de patógenos e aumentar as chances de reconhecer um determinado alvo. Vários trabalhos mostraram que indivíduos com presença de um único alelo de HLA-DR capaz de fazer interações com epítomos do YF-17DD poderia desenvolver uma resposta de linfócitos T CD4+ contra o YF-17DD (DE MELO et al., 2013; JAMES et al., 2013; MATEUS et al., 2020; STRYHN et al., 2020).

Nossa abordagem mostrou que indivíduos com repertórios de HLAs com alta capacidade predita para apresentar antígenos do YF-17DD também tem uma grande chance de ser bons apresentadores de antígenos de outros vírus, incluindo *Flavivirus*. A reatividade cruzada da resposta imune celular e humoral entre *Flavivirus* tem sido amplamente relatada. De fato, a reatividade cruzada entre *Flavivirus* é um grande problema que impede o diagnóstico sorológico diferenciado de arboviroses em regiões tropicais com alta incidência de infecções por *Flavivirus*. Isso nos indica o alto nível de conservação de epítomos entre esses vírus, sugerindo que muitos desses peptídeos conservados possam ser apresentados pelos mesmos alelos de HLAs que apresentam antígenos de um ou outro *Flavivirus*. Brandiriss e colaboradores

mostraram que coelhos imunizados com fragmentos da proteína E do YF-17D apresentavam título de anticorpos similares contra YF-17D e DENV2, indicando que entre esses vírus há determinantes antigênicos conservados que podem não só estimular clones de linfócitos B com reatividade cruzada, mas também ser apresentados pelas mesmas moléculas de HLAs que apresentam antígenos de um ou outro vírus (BRANDRISS; SCHLESINGER; WALSH, 1990). Versiani e colaboradores analisaram todo o proteoma dos sorotipos do DENV, do ZIKV e o YFV em busca de epítomos lineares para linfócitos B e encontraram que nas proteínas desses vírus existem epítomos conservados que podem levar a reatividade cruzada na resposta humoral contra esses patógenos (VERSIANI et al., 2019). Lund e colaboradores mostraram que muitos peptídeos do YF-17DD e do DENV podem ser apresentados pelas mesmas moléculas de HLA tal como foi mostrado em nossos resultados. Por outro lado, diversos estudos destacam que certos alelos de HLA estão associados com suscetibilidade ou resistência a dengue (APPANNA et al., 2010; LAFLEUR et al., 2002; LAN et al., 2008; MALAVIGE et al., 2011; XAVIER EURICO DE ALENCAR et al., 2013). No entanto, esses estudos não investigaram se a dengue podia estar relacionada à capacidade desses HLA apresentarem antígenos do DENV. Esses estudos também não determinaram se o risco aumentado de manifestações clínicas da dengue poderia estar associado à resposta hiperativa de linfócitos T ou, inversamente, se uma resposta mais fraca de linfócitos T pode estar associada a um risco de manifestações clínicas graves da dengue. Weiskopf e colaboradores mostraram elegantemente que a suscetibilidade a dengue associada ao HLA está relacionada com respostas fracas em linfócitos T (medida pela produção de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 após estimulação com epítomos do DENV), e que a resistência à doença associada ao HLA estaria associada a respostas de linfócito T mais robustas (WEISKOPF et al., 2013). Mais interessante ainda, os autores utilizaram as ferramentas bioinformáticas disponibilizadas pela IEDB para prever peptídeos dentro das poliproteínas dos sorotipos dos DENVs, e encontraram que os linfócitos estimulados com os peptídeos previstos apresentaram respostas fortes (WEISKOPF et al., 2013). Os alelos de HLA correlacionados com respostas fortes foram os alelos HLA-A\*02:06, HLA-A\*02:01, HLA-A\*68:01, HLA-A\*11:01, HLA-A\*03:01, HLA-A\*33:01, HLA-B\*15:01, HLA-B\*57:01, HLA-B\*58:01, HLA-B\*07:02, HLA-B\*40:01 e HLA-B\*51:01, e três ou quatro desses alelos estavam presente no repertório de HLA-

I do 90% dos indivíduos estudado (WEISKOPF et al., 2013). Uma possível explicação para essas observações seria que certos alelos de HLAs estão associados a respostas de maior magnitude, que por sua vez estão associadas a graus mais altos de multifuncionalidade e, portanto, podem ser mais benéficas na proteção contra doenças. Curiosamente, os HLAs que Weiskopf e colaboradores encontraram associados a maior resposta de linfócitos T e proteção à dengue, foram os mesmos HLAs que encontramos em nosso estudo como ótimos apresentadores de antígenos. Isto sugere fortemente que os HLAs têm um papel extremamente importante na indução da resposta imune protetora contra *Flavivirus* e a presença ou não de alelos de HLAs bons apresentadores de antígenos no repertório de HLAs do hospedeiro podem definir o desfecho da infecção por um *Flavivirus*.

Finalmente, nossa abordagem mostrou que indivíduos com repertórios de HLA compostos por alelos capazes de fazer muitas interações com as proteínas do YF-17DD, ou seja, repertórios de HLA compostos por alelos com ampla capacidade para ligar antígenos do YF-17DD, apresentaram maior título de anticorpos neutralizantes anti-YF-17DD (PRNT) do que os indivíduos com repertório de HLA com pouca capacidade de apresentação de antígenos do YF-17DD.

O locus do HLA é o segmento gênico mais variável no genoma humano, e a variabilidade dos alelos do HLA em diferentes populações está bem documentada (MIDDLETON et al., 2003). Certos alelos de HLA de classe I e de classe II tem sido relatados com maior frequência em algumas populações e regiões geográficas, e sua prevalência tem sido relatada com um papel protetor frente a alguns patógenos (APPS et al., 2013; AXELSSON-ROBERTSON et al., 2013; BHATTACHARYA et al., 2007; YU et al., 2008). Diversos são os trabalhos que mostram que a disponibilidade ou não de determinados alelos de HLAs no repertório de um indivíduo pode estar associada com a proteção dele frente a patógenos potencialmente mortais. Por exemplo, um estudo de um grupo de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) mostrou que a presença dos alelos HLA-B\*37, -B\*13, -B\*58 e -B\*81 em seu repertório de HLA está relacionada com alta proporção de linfócitos T CD8+ que produzem IFN- $\gamma$  e IL-2 em resposta a peptídeos do HIV. Além disso, nesses indivíduos os níveis de RNA do HIV são indetectáveis ainda na ausência de terapia anti-retroviral. Em contrastes, indivíduos que não tem disponíveis esses alelos em seu repertório de HLA, não apresentam alta frequência de linfócitos produtores de IFN- $\gamma$  e IL-2 nem



capacidade para conter a carga viral (EMU et al., 2008). Outro estudo mostrou que a alta expressão dos HLAs-C está associado com redução da carga viral e redução da taxa de progressão para baixas contagens de linfócitos T CD4+ em afro-americanos e europeus infectados pelo HIV. A alta expressão de HLA-C provavelmente promoveu um melhor controle do HIV por meio da ativação de linfócitos T citotóxico mediada pela eficaz apresentação de antígenos restritos aos alelos de HLA-C promovendo o controle da viremia (APPS et al., 2013). Por outro lado, um dos mecanismos usados pelo HIV para escapar da resposta dos linfócitos T é a mudança na sequência aa de epítomos que por suas mutações fazem que não só anticorpos e TCRs, mas também os próprios HLAs percam afinidade e não consigam interagir com eles para apresentá-los aos linfócitos T (BASHIROVA; THOMAS; CARRINGTON, 2011; BHATTACHARYA et al., 2007; IVERSEN et al., 2006). Esses resultados mostram a grande importância de determinados alelos de HLA e sua ligação ao antígeno na ativação da resposta imune mediada por linfócitos T e proteção contra os patógenos.

Outros estudos mostraram que os alelos de HLA-DQA1\*0301 -DQB1\*0301, DQA1\*0501 -DQB1\*0301, DRB1\*1101 e -DQB1\*0301 estão associados com baixa lesão hepática em indivíduos infectados com o vírus da hepatite C (YU et al., 2008). Por outro lado, a presença dos genes HLA-DRB1\*07:01, -DQB1\*03:01, -DQB1\*04:02, -DQA1\*04:01 e HLA-DQA1\*05:01 demonstraram proteção contra a tuberculose pulmonar em indivíduos que dispõem desses alelos em seu repertório (OLIVEIRA-CORTEZ et al., 2016). Um outro estudo revelou os alelos HLA-B\*53, -DRB1\*13:02, -DQB1\*05:01 estão associados com proteção contra a malária grave (causada pelo *Plasmodium falciparum*) em crianças da África (HILL et al., 1991). Em geral, todos esses dados demonstram que o extraordinário polimorfismo do antígeno leucocitário humano evoluiu principalmente através da seleção natural por forças seletivas determinadas pelos patógenos infecciosos; uma vez que as variações genéticas na região altamente polimórfica do HLA contribui com a grande diversidade de moléculas de HLA capazes de ligar componentes do patógenos para serem apresentados aos linfócitos T, e a disponibilidade de alelos de HLA capazes de fazer interações com os antígenos do patógeno, podem definir o desfecho da infecção, favorecendo a sobrevivência do hospedeiro. Nossos resultados afirmam este fenômeno biológico e suportam nossa hipótese de que a disponibilidade de alelos de HLA capazes de fazer muitas interações com os antígenos do YF-17DD, podem definir a

capacidade de um indivíduo para desenvolver uma resposta imune protetora contra a YF, e favorecer o a sobrevivência do hospedeiro na eventual infecção pelo YFV.

## 6. CONCLUSÕES

As proteínas mais imunogênicas preditas por métodos de bioinformática para os vírus YFV e YF-17DD foram NS5, NS3, NS1, NS2A e E. As proteínas menos imunogênicas foram NS2B, prM e C.

Os HLA com maior capacidade predita para apresentar antígenos do YF-17DD, YFV, ZIKV e DENV1 são os alelos HLA-A\*02:01, A\*11:01, A\*02:03, A\*02:06, A\*31:01, A\*68:01, A\*68:02, A\*30:01, B\*15:01, B\*57:01, DRB5\*01:01, DRB1\*09:01, DRB1\*01:01, DRB1\*07:01, DRB1\*11:01, DRB1\*03:01, DRB1\*13:02, DRB1\*15:01, DRB4\*01:01.

A capacidade predita de um indivíduo para apresentar antígenos YF-17DD está relacionada à sua capacidade para produzir anticorpos neutralizantes anti-YF-17DD o que estaria correlacionado com imunidade protetora contra YF.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, E. J.; LUOMA, A. M. The adaptable major histocompatibility complex (MHC) fold: structure and function of nonclassical and MHC class I-like molecules. *Annual Review of Immunology*, v. 31, p. 529–561, 2013.

AKONDY, R. S. et al. Initial viral load determines the magnitude of the human CD8 T cell response to yellow fever vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 10, p. 3050–3055, 10 mar. 2015.

AKONDY, R. S. et al. The Yellow Fever Virus Vaccine Induces a Broad and Polyfunctional Human Memory CD8+ T Cell Response. *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 12, p. 7919–7930, 15 dez. 2009.

ALI, S. et al. Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 11, n. 2, p. e0005135, fev. 2017.

APPANNA, R. et al. Susceptible and Protective HLA Class 1 Alleles against Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Patients in a Malaysian Population. *PLoS ONE*, v. 5, n. 9, 2010.

APPS, R. et al. Influence of HLA-C expression level on HIV control. *Science*, v. 340, n. 6128, p. 87–91, 5 abr. 2013.

APPS, R. et al. Relative Expression Levels of the HLA Class-I Proteins in Normal and HIV-Infected Cells. *The Journal of Immunology*, v. 194, n. 8, p. 3594–3600, 15 abr. 2015.

APTE-SENGUPTA, S.; SIROHI, D.; KUHN, R. J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. *Current Opinion in Virology, Virus replication animals and plants/Roseoloviruses*. v. 9, p. 134–142, 1 dez. 2014.

AXELSSON-ROBERTSON, R. et al. A Broad Profile of Co-Dominant Epitopes Shapes the Peripheral Mycobacterium tuberculosis Specific CD8+ T-Cell Immune Response in South African Patients with Active Tuberculosis. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, 26 mar. 2013.

BARBA-SPAETH, G. et al. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *Journal of Experimental Medicine*, v. 202, n. 9, p. 1179–1184, 31 out. 2005.

BARRETT, A. D. T. Yellow fever live attenuated vaccine: A very successful live attenuated vaccine but still we have problems controlling the disease. *Vaccine*, v. 35, n. 44, p. 5951–5955, 20 out. 2017.

BARRETT, A. D. T.; HIGGS, S. Yellow Fever: A Disease that Has Yet to be Conquered. *Annual Review of Entomology*, v. 52, n. 1, p. 209–229, 12 dez. 2006.

BARRETT, A. D.; TEUWEN, D. E. Yellow fever vaccine—how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Current Opinion in Immunology, Lymphocyte activation and effector functions / Vaccines*. v. 21, n. 3, p. 308–313, 1 jun. 2009.

BASHIROVA, A. A. et al. The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning the Genome for Defense, v. 7, p. 277–300, 1 set. 2006.

BASHIROVA, A. A.; THOMAS, R.; CARRINGTON, M. HLA/KIR Restraint of HIV: Surviving the Fittest. *Annual review of immunology*, v. 29, p. 295, 23 abr. 2011.

BASTOS, L. A. et al. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine*, v. 32, n. 39, p. 4977–4984, 3 set. 2014.

BHATTACHARYA, T. et al. Founder effects in the assessment of HIV polymorphisms and HLA allele associations. *Science*, v. 315, n. 5818, p. 1583–1586, 16 mar. 2007.

BLOM, K. et al. Temporal Dynamics of the Primary Human T Cell Response to Yellow Fever Virus 17D As It Matures from an Effector- to a Memory-Type Response. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 5, p. 2150–2158, 1 mar. 2013.

BRANDRISS, M. W.; SCHLESINGER, J. J.; WALSH, E. E. Immunogenicity of a Purified Fragment of 170 Yellow Fever Envelope Protein. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 161, n. 6, p. 1134–1139, 1 jun. 1990.

BRESSANELLI, S. et al. Structure of a *Flavivirus* envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *The EMBO Journal*, v. 23, n. 4, p. 728–738, 25 fev. 2004.

CHARLES A JANEWAY, J. et al. The major histocompatibility complex and its functions. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition, 2001.

CHAUHAN, V.; SINGH, M. P.; RATHO, R. K. Identification of T cell and B cell epitopes against Indian HCV-genotype-3a for vaccine development- An in silico analysis. *Biologicals*, v. 53, p. 63–71, 1 maio 2018.

CLEMENTS, A. N.; HARBACH, R. E. History of the discovery of the mode of transmission of yellow fever virus. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology*, v. 42, n. 2, p. 208–222, dez. 2017.

CO, M. D. T. et al. Human Cytotoxic T Lymphocyte Responses to Live Attenuated 17D Yellow Fever Vaccine: Identification of HLA-B35-Restricted CTL Epitopes on Nonstructural Proteins NS1, NS2b, NS3, and the Structural Protein E. *Virology*, v. 293, n. 1, p. 151–163, 1 fev. 2002.

CONG, Y. et al. Characterization of Yellow Fever Virus Infection of Human and Non-human Primate Antigen Presenting Cells and Their Interaction with CD4+ T Cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 5, p. e0004709, 18 maio 2016.

COOK, K. D.; WAGGONER, S. N.; WHITMIRE, J. K. NK Cells and Their Ability to Modulate T Cells during Virus Infections. *Critical reviews in immunology*, v. 34, n. 5, p. 359–388, 2014.

COSTA-ROCHA, I. A. DA et al. Duration of Humoral and Cellular Immunity 8 Years After Administration of Reduced Doses of the 17DD-Yellow Fever Vaccine. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1211, 2019.

DA COSTA NEVES, P. C. et al. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine*, v. 27, n. 41, p. 5543–5549, set. 2009.

DE MELO, A. B. et al. T-Cell Memory Responses Elicited by Yellow Fever Vaccine are Targeted to Overlapping Epitopes Containing Multiple HLA-I and -II Binding Motifs. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 1, p. e1938, 2013.

DELATORRE, E. et al. Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 2019.

DEWITT, W. S. et al. Dynamics of the Cytotoxic T Cell Response to a Model of Acute Viral Infection. *Journal of Virology*, v. 89, n. 8, p. 4517–4526, 15 abr. 2015.

DOUAM, F.; PLOSS, A. Yellow fever virus: Knowledge gaps impeding the fight against an old foe. *Trends in microbiology*, v. 26, n. 11, p. 913–928, nov. 2018.

DOWNS, I. et al. CITA/NLRC5: A critical transcriptional regulator of MHC class I gene expression. *BioFactors*, v. 42, n. 4, p. 349–357, 2016.

EMU, B. et al. HLA Class I-Restricted T-Cell Responses May Contribute to the Control of Human Immunodeficiency Virus Infection, but Such Responses Are Not

Always Necessary for Long-Term Virus Control. *Journal of Virology*, v. 82, n. 11, p. 5398, jun. 2008.

FERREIRA, C. DE C. et al. The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences. *Expert review of vaccines*, v. 17, n. 1, p. 79–90, 2 jan. 2018.

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clinics in Laboratory Medicine, Emerging Pathogens*. v. 30, n. 1, p. 237–260, 1 mar. 2010.

GARSKE, T. et al. Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS medicine*, v. 11, n. 5, p. e1001638, maio 2014.

GERRITSEN, B.; PANDIT, A. The memory of a killer T cell: models of CD8(+) T cell differentiation. *Immunology and Cell Biology*, v. 94, n. 3, p. 236–241, mar. 2016.

GÓMEZ, S. Y.; OCAZIOEZ, R. E. [Yellow fever virus 17D neutralising antibodies in vaccinated Colombian people and unvaccinated ones having immunity against dengue]. *Revista de salud publica (Bogota, Colombia)*, v. 10, n. 5, p. 796–807, 2008.

GÓMEZ, S. Y.; OCAZIOEZ, R. E. Anticuerpos Neutralizantes contra el Virus de la Fiebre Amarilla 17 D en Colombianos Vacunados y no Vacunados con Inmunidad a Dengue. *Revista de Salud Pública*, v. 10, n. 5, p. 796–807, nov. 2008.

GOTUZZO, E.; YACTAYO, S.; CÓRDOVA, E. Efficacy and Duration of Immunity after Yellow Fever Vaccination: Systematic Review on the Need for a Booster Every 10 Years. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, n. 3, p. 434–444, 4 set. 2013.

GROOT, H.; RIBERIRO, R. B. Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to yellow fever 17 years after vaccination with 17D vaccine. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 27, n. 6, p. 699, 1962.

HAHN, C. S. et al. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 84, n. 7, p. 2019–2023, abr. 1987.

HAMMER, J. et al. High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, n. 10, p. 4456–4460, 10 maio 1994.

HILL, A. V. S. et al. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 1991 352:6336, v. 352, n. 6336, p. 595–600, 1991.

ISSUR, M. et al. The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *RNA*, v. 15, n. 12, p. 2340–2350, 12 jan. 2009.

IVERSEN, A. K. N. et al. Conflicting selective forces affect T cell receptor contacts in an immunodominant human immunodeficiency virus epitope. *Nature Immunology* 2006 7:2, v. 7, n. 2, p. 179–189, 1 jan. 2006.

JAMES, C. et al. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 98, n. 5, p. 315–329, 1 maio 2020.

JAMES, E. A. et al. Yellow Fever Vaccination Elicits Broad Functional CD4 + T Cell Responses That Recognize Structural and Nonstructural Proteins. *Journal of Virology*, v. 87, n. 23, p. 12794–12804, 1 dez. 2013.

JAMES, E. A. et al. Yellow Fever Vaccination Elicits Broad Functional CD4 + T Cell Responses That Recognize Structural and Nonstructural Proteins. *Journal of Virology*, v. 87, n. 23, p. 12794–12804, dez. 2013.

JAMESON, S. C.; MASOPUST, D. Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity*, v. 48, n. 2, p. 214–226, 20 fev. 2018.

JURTZ, V. et al. NetMHCpan 4.0: Improved peptide-MHC class I interaction predictions integrating eluted ligand and peptide binding affinity data. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*, v. 199, n. 9, p. 3360–3368, 1 nov. 2017.

KHAIBOULLINA, S. F. et al. Yellow fever virus strains Asibi and 17D-204 infect human umbilical cord endothelial cells and induce novel changes in gene expression. *Virology*, v. 342, n. 2, p. 167–176, 25 nov. 2005.

KIM, Y. et al. Immune epitope database analysis resource. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. W1, p. W525–W530, 1 jul. 2012.

KONGSGAARD, M. et al. Adaptive immune responses to booster vaccination against yellow fever virus are much reduced compared to those after primary vaccination. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 662, 6 abr. 2017.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. *Journal of Virology*, v. 72, n. 1, p. 73–83, jan. 1998.



LAFLEUR, C. et al. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Human Immunology*, v. 63, n. 11, p. 1039–1044, 1 nov. 2002.

LAN, N. T. P. et al. Protective and Enhancing HLA Alleles, HLA-DRB1\*0901 and HLA-A\*24, for Severe Forms of Dengue Virus Infection, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n. 10, jul. 2008.

LAW, H. et al. Tfh Cells in Health and Immunity: Potential Targets for Systems Biology Approaches to Vaccination. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 22, p. 8524, jan. 2020.

LEE, E.; LOBIGS, M. E protein domain III determinants of yellow fever virus 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. *Journal of Virology*, v. 82, n. 12, p. 6024–6033, jun. 2008.

LORENZ, I. C. et al. Intracellular Assembly and Secretion of Recombinant Subviral Particles from Tick-Borne Encephalitis Virus. *Journal of Virology*, v. 77, n. 7, p. 4370–4382, 1 abr. 2003.

LU, L. L. et al. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, v. 18, n. 1, p. 46–61, jan. 2018.

LUND, O. et al. Correction: Human Leukocyte Antigen (HLA) Class I Restricted Epitope Discovery in Yellow Fever and Dengue Viruses: Importance of HLA Binding Strength. *PLoS ONE*, v. 6, n. 11, p. e26494, 9 nov. 2011.

MALAVIGE, G. N. et al. HLA Class I and Class II Associations in Dengue Viral Infections in a Sri Lankan Population. *PLoS ONE*, v. 6, n. 6, 2011.

MARTIN, M. D.; BADOVINAC, V. P. Defining Memory CD8 T Cell. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 2692, 2018.

MARTINI, S. et al. The Immune Epitope Database and Analysis Resource Program 2003–2018: reflections and outlook. *Immunogenetics*, v. 72, n. 1, p. 57–76, 1 fev. 2020.

MARTINS, M. Â. et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine*, v. 26, n. 9, p. 1173–1184, 26 fev. 2008.

MARY DAWN T. CO, M. T. J. C. F. A. E. A. L. ROTHMAN. Human Cytotoxic T Lymphocyte Responses to Live Attenuated 17D Yellow Fever Vaccine: Identification

of HLA-B35-Restricted CTL Epitopes on Nonstructural Proteins NS1, NS2b, NS3, and the Structural Protein E | Elsevier Enhanced Reader. 15 jan. 2022.

MATEUS, J. et al. Identification of Novel Yellow Fever Class II Epitopes in YF-17D Vaccines. *Viruses*, v. 12, n. 11, p. 1300, nov. 2020.

MATEUS, J. et al. Identification of Novel Yellow Fever Class II Epitopes in YF-17D Vaccines. *Viruses*, v. 12, n. 11, 1 nov. 2020.

MCELROY, K. L. et al. Characterization of the antigen distribution and tissue tropisms of three phenotypically distinct yellow fever virus variants in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, v. 8, n. 5, p. 675–687, out. 2008.

MEDLOCK, J. et al. Effectiveness of UNAIDS targets and HIV vaccination across 127 countries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 15, p. 4017–4022, 11 abr. 2017.

MEI, S. et al. A comprehensive review and performance evaluation of bioinformatics tools for HLA class I peptide-binding prediction. *Briefings in Bioinformatics*, v. 21, n. 4, p. 1119–1135, 4 maio 2020.

MELO, A. B. DE et al. T-Cell Memory Responses Elicited by Yellow Fever Vaccine are Targeted to Overlapping Epitopes Containing Multiple HLA-I and -II Binding Motifs. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 1, p. e1938, 31 jan. 2013.

MERCADO, E. S. et al. HLA-A\*33:01 as Protective Allele for Severe Dengue in a Population of Filipino Children. *PLOS ONE*, v. 10, n. 2, p. e0115619, 6 fev. 2015.

MESTER, G.; HOFFMANN, V.; STEVANOVIĆ, S. Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 68, n. 9, p. 1521–1532, 1 maio 2011.

MIDDLETON, D. et al. New allele frequency database: <http://www.allelefrequencies.net>. *Tissue Antigens*, v. 61, n. 5, p. 403–407, 1 maio 2003.

MINTZ, M. A.; CYSTER, J. G. T follicular helper cells in germinal center B cell selection and lymphomagenesis. *Immunological Reviews*, v. 296, n. 1, p. 48–61, 2020.

MONATH, T. P. Yellow fever vaccine. *Expert Review of Vaccines*, v. 4, n. 4, p. 553–574, 1 ago. 2005.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 13–22, jan. 2005.

NEEFJES, J. et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 12, p. 823–836, dez. 2011.

NIEDRIG, M. et al. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Tropical Medicine & International Health*, v. 4, n. 12, p. 867–871, 1999.

NIELSEN, M. et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Science*, v. 12, n. 5, p. 1007–1017, 2003.

OISHI, Y.; MANABE, I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *International Immunology*, 25 ago. 2018.

OLIVEIRA-CORTEZ, A. et al. Do HLA class II genes protect against pulmonary tuberculosis? A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 35, n. 10, p. 1567–1580, 1 out. 2016.

PALMER, D. R. et al. Restricted replication and lysosomal trafficking of yellow fever 17D vaccine virus in human dendritic cells. *The Journal of General Virology*, v. 88, n. Pt 1, p. 148–156, jan. 2007.

PERDOMO-CELIS, F. et al. T-Cell Response to Viral Hemorrhagic Fevers. *Vaccines*, v. 7, n. 1, p. 11, mar. 2019.

PERRY, A. K. et al. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Research*, v. 15, n. 6, p. 407–422, jun. 2005.

POLAND, J. D. et al. Persistence of neutralizing antibody 30–35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 59, n. 6, p. 895–900, 1981.

PULENDRAN, B. et al. Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. *Immunological Reviews*, v. 255, n. 1, p. 243–255, 2013.

QUEREC, T. D. et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nature Immunology*, v. 10, n. 1, p. 116–125, jan. 2009.

QUEREC, T. et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 203, n. 2, p. 413–424, 20 fev. 2006.

REED, W. et al. The Etiology of Yellow Fever—A Preliminary Note. *Public Health Papers and Reports*, v. 26, p. 37–53, 1900.

SACCHETTO, L. et al. Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017-2018 yellow fever outbreaks in Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 10, p. e0008658, 5 out. 2020.

SHEARER, F. M. et al. Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. *The Lancet. Infectious Diseases*, v. 17, n. 11, p. 1209–1217, nov. 2017.

SILVA, N. I. O. et al. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virology Journal*, v. 17, 23 jan. 2020.

SMITH, H. H. et al. Yellow Fever Vaccination with Cultured Virus (17D) without Immune Serum. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. s1-18, n. 5, p. 437–468, 1 set. 1938.

SOPER, F. L. et al. YELLOW FEVER WITHOUT AËDES AEGYPTI. STUDY OF A RURAL EPIDEMIC IN THE VALLE DO CHANAAN, ESPIRITO SANTO, BRAZIL, 1932\*. *American Journal of Epidemiology*, v. 18, n. 3, p. 555–587, 1 nov. 1933.

STOKES, A.; BAUER, J. H.; HUDSON, N. P. THE TRANSMISSION OF YELLOW FEVER TO MACACUS RHESUS: PRELIMINARY NOTE. *Journal of the American Medical Association*, v. 90, n. 4, p. 253–254, 28 jan. 1928.

STRYHN, A. et al. A Systematic, Unbiased Mapping of CD8+ and CD4+ T Cell Epitopes in Yellow Fever Vaccinees. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 1836, 31 ago. 2020.

SUN, J. C.; WILLIAMS, M. A.; BEVAN, M. J. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nature Immunology* 2004 5:9, v. 5, n. 9, p. 927–933, 8 ago. 2004.

THEILER, M.; SMITH, H. H. THE EFFECT OF PROLONGED CULTIVATION IN VITRO UPON THE PATHOGENICITY OF YELLOW FEVER VIRUS. *Journal of Experimental Medicine*, v. 65, n. 6, p. 767–786, 1 jun. 1937b.

THEILER, M.; SMITH, H. H. THE USE OF YELLOW FEVER VIRUS MODIFIED BY IN VITRO CULTIVATION FOR HUMAN IMMUNIZATION. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 65, n. 6, p. 787–800, 31 maio 1937a.

VALIM, V. et al. Planned Yellow Fever Primary Vaccination Is Safe and Immunogenic in Patients With Autoimmune Diseases: A Prospective Non-interventional Study. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 2020.

VERSIANI, A. F. et al. Identification of B-Cell Epitopes with Potential to Serologically Discriminate Dengue from Zika Infections. *Viruses* 2019, Vol. 11, Page 1079, v. 11, n. 11, p. 1079, 19 nov. 2019.

VITA, R. et al. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D339–D343, 8 jan. 2019.

WANG, P. et al. A Systematic Assessment of MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach. *PLOS Computational Biology*, v. 4, n. 4, p. e1000048, 4 abr. 2008.

WANG, P. et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics*, v. 11, n. 1, p. 568, 22 nov. 2010.

WEISKOPF, D. et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 22, p. E2046, 28 maio 2013.

WHO. Yellow fever. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>>. Acesso em: 8 set. 2021.

WIETEN, R. W. et al. 17D yellow fever vaccine elicits comparable long-term immune responses in healthy individuals and immune-compromised patients. *Journal of Infection*, v. 72, n. 6, p. 713–722, 1 jun. 2016.

WIETEN, R. W. et al. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination. *PLOS ONE*, v. 11, n. 3, p. e0149871, 1 mar. 2016.

WOODSON, S. E.; FREIBERG, A. N.; HOLBROOK, M. R. Differential cytokine responses from primary human Kupffer cells following infection with wild-type or vaccine strain yellow fever virus. *Virology*, v. 412, n. 1, p. 188–195, 30 mar. 2011.

XAVIER EURICO DE ALENCAR, L. et al. HLA-B\*44 Is Associated with Dengue Severity Caused by DENV-3 in a Brazilian Population. *Journal of Tropical Medicine*, v. 2013, 2013.

YU, R.-B. et al. The association between the genetic polymorphism of HLA-DQA1, DQB1, and DRB1 and serum alanine aminotransferase levels in chronic hepatitis C in the Chinese population. *Journal of gastroenterology and hepatology*, v. 23, n. 9, p. 1394–402, set. 2008.

ZAJAC, A. J. et al. Viral Immune Evasion Due to Persistence of Activated T Cells Without Effector Function. *Journal of Experimental Medicine*, v. 188, n. 12, p. 2205–2213, 21 dez. 1998.

ZHANG, Y. et al. Conformational Changes of the Flavivirus E Glycoprotein. *Structure*, v. 12, n. 9, p. 1607–1618, 1 set. 2004.