

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Thais Abdala Torres

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA INDUZIDA PELA DOSE
FRACIONADA DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA**

Belo Horizonte
2021

THAIS ABDALA TORRES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA INDUZIDA PELA DOSE
FRACIONADA DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Belo Horizonte
2021

043

Torres, Thais Abdala.

Avaliação da resposta imune adaptativa induzida pela dose fracionada da vacina contra a febre amarela [manuscrito] / Thais Abdala Torres. – 2021.
71 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli.

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

1. Bioquímica e imunologia. 2. Febre Amarela. 3. Vacinas. 4. Uso Off-Label. 5. Imunidade Adaptativa. I. Antonelli, Lis Ribeiro do Valle. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. 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 THAIS ABDALA TORRES.
 Aos vinte dias do mês de abril de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” pela plataforma “meet.google.com”, 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 "Avaliação da resposta imune adaptativa induzida pela dose fracionada da vacina contra a Febre Amarela", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Lis Ribeiro do Valle Antonelli, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli - Orientadora (Focruz/MG), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de abril de 2021.

Dra. Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis (UFMG)

Dra. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)

Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli - Orientadora (Focruz/MG)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha orientadora, Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli, por todos os ensinamentos ao longo dos anos em que tive o prazer de trabalhar sob sua orientação. Seu apoio contribuiu não só com o andamento deste trabalho, mas também com o meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço também ao Dr. Olindo Assis Martins Filho pela oportunidade de fazer parte do projeto de febre amarela, e por confiar na minha capacidade de realizar este estudo que poderá trazer um retorno muito importante para a sociedade.

Agradeço a toda a equipe do Instituto René Rachou, principalmente ao grupo de Biologia e Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias (BIP) e ao Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) que me auxiliou ao longo do desenvolvimento deste projeto. Destaque para a Dra. Ana Carolina Campi-Azevedo e Dra. Andréa Teixeira de Carvalho do GIPB, Priscilla Miranda Henriques e Dra. Luara Isabela dos Santos do BIP, e a Ana Beatriz Ribeiro de Queiroz e Dayane Andriotti Otta da Plataforma de Citometria de Fluxo.

Às agências de fomento que nos permitiram a realização deste projeto: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao Ministério da Saúde/Fundo Nacional de Saúde (Termo de Execução Descentralizada de Recursos Nº 25000.078609/2018-52). Agradeço também ao Instituto René Rachou (Fiocruz/MG) por nos permitir utilizar suas dependências para a realização dos nossos experimentos, ao Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), ao Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) e Laboratório de Tecnologia Imunológica (LATIM) de Bio-Manguinhos (Fiocruz/RJ), e ao Laboratório de Investigação Médica da Universidade de São Paulo (USP) pelas colaborações no projeto.

Aos meus pais, Simone Abdala e Paulo Henrique, e ao Lucas Andrade, por todo o suporte emocional durante o desenvolvimento deste projeto que demandou muito esforço e muitas horas de dedicação, o meu muito obrigada por estarem presentes ao longo dessa jornada. E agradeço também toda a minha família e aos meus amigos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

A febre amarela é uma doença viral causada por um arbovírus de RNA da família *Flaviviridae*, endêmica no continente Africano, na América Central e América do Sul (“World Health Organization (WHO) - Yellow Fever Fact Sheet”, 2019). É transmitida pela picada do mosquito *Aedes aegypti* infectado, e podem ocorrer grandes casos de epidemia da infecção quando há introdução do vírus em uma região populosa e com grande densidade do mosquito vetor. A infecção pode ser assintomática ou os sintomas podem ser inespecíficos, incluindo febre, calafrios, dores de cabeça e no corpo, náuseas e vômitos (“Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Yellow Fever”, 2019). Sintomas mais graves como icterícia, sangramentos e falhas de órgãos podem ocorrer e estão associados à maior mortalidade. Como forma de prevenção, existe uma vacina composta de vírus atenuado denominada 17D, homônima à cepa do vírus empregado na sua produção, que vem sendo utilizada há aproximadamente 8 décadas (THEILER; SMITH, 1937a). Sabe-se que nos primeiros dias após a primeira dose da vacina ocorre uma elevação no número de linfócitos B ativados, consistente com o aumento de imunoglobulinas circulantes e de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ ativados (MARTINS et al., 2007). Além disso, ocorre também a indução de linfócitos T $CD8^+$ de memória capazes de se autorrenovar e que podem se manter estáveis por até 25 anos (FUERTES MARRACO et al., 2015). Observa-se também um perfil misto de citocinas pró e anti-inflamatórias (SILVA et al., 2011), e a produção de anticorpos neutralizantes que podem durar até anos após as duas doses (CAMPI-AZEVEDO et al., 2019)

No entanto, esse vírus atenuado é expresso em embriões de galinha (THEILER; SMITH, 1937a), e isso limita a capacidade de sua produção devido à necessidade de embriões livres de patógenos, cuja disponibilidade é limitada, e o baixo rendimento, se obtendo poucas doses por embrião (de 100 a 300 doses). Além disso, apenas 4 produtores da vacina são qualificados pela Organização Mundial de Saúde (MONATH, 2005). Assim, houve a necessidade de se testar a utilização de doses fracionadas para a vacinação de pessoas residentes em áreas de risco. Essa dose foi estabelecida em um quinto da dose regular da vacina comum (“World Health Organization - Fractional dose yellow fever vaccine as a dose-sparing option for outbreak response”, 2016). Comprovadamente, a dose fracionada foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes contra o vírus da febre amarela e induziu uma resposta pró- inflamatória muito similar à gerada após administração da dose regular da vacina (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014). Esses resultados, então, comprovam que a dose fracionada é eficaz e passível de ser administrada.

Com esse projeto, pretendemos avaliar a capacidade da dose fracionada da vacina contra a febre amarela de gerar células T e B efetoras, plasmócitos produtores de anticorpos e subpopulações celulares de memória que participam da resposta imune contra o vírus. Temos particular interesse no eixo células T auxiliares foliculares (Tfh) e células B. Esse estudo nos permitirá entender melhor a cinética da imunidade contra a febre amarela induzida pela vacina e avaliar se a dose fracionada, que vem sendo amplamente utilizada em regiões de risco, induz memória imunológica humoral e celular semelhante à dose plena.

Palavras-chave: Febre amarela. Vacina. Dose fracionada. Imunidade adaptativa.

ABSTRACT

Yellow fever is a viral disease caused by an RNA arbovirus in the family Flaviviridae, endemic in the African continent, Central America and South America (“World Health Organization (WHO) - Yellow Fever Fact Sheet”, 2019). It is transmitted by the bite of the infected *Aedes aegypti* mosquito, and large cases of infection epidemics can occur when the virus is introduced into a populous region with a high density of the vector mosquito. The infection may be asymptomatic, or the symptoms may be nonspecific, including fever, chills, headaches and body aches, nausea and vomiting (“Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Yellow Fever”, 2019). More serious symptoms such as jaundice, bleeding and organ failure can occur and are associated with increased mortality.

As a form of prevention, there is a vaccine composed of attenuated virus called 17D, homonymous with the strain of the virus used in its production, which has been used for approximately 8 decades (THEILER; SMITH, 1937a). It is known that in the first days after the first dose of the vaccine, there is an increase in the number of activated B lymphocytes, consistent with an increase in circulating immunoglobulins and activated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes (MARTINS et al., 2007). In addition, there is an induction of memory CD8⁺ T lymphocytes capable of self-renewal, which can remain stable for up to 25 years (FUERTES MARRACO et al., 2015). There is also a mixed profile of pro and anti-inflammatory cytokines (SILVA et al., 2011) and the production of neutralizing antibodies that can last for many years after the two vaccine doses (CAMPI-AZEVEDO et al., 2019).

However, this attenuated virus is expressed in chicken embryos (THEILER; SMITH, 1937a), and this limits its production capacity due to the need for pathogen-free embryos, whose availability is limited, and the low number of doses that can be generated by each embryo (from 100 to 300 doses). In addition, only 4 vaccine manufacturers are qualified by the World Health Organization (MONATH, 2005), generating the need to vaccinate people in risk areas with fractional doses, which consist of vaccines with one fifth of the regular dose (“World Health Organization - Fractional dose yellow fever vaccine as a dose-sparing option for outbreak response”, 2016). It has been shown that the fractionated dose was able to induce neutralizing antibodies against the yellow fever virus and induced a pro-inflammatory response very similar to that generated after administration of the regular dose of the vaccine (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014). These results indicated that the fractional dose is effective and can be administered.

With this project, we intend to evaluate the capacity of the fractionated dose of the yellow fever vaccine to generate effector T and B cells, antibody-producing plasma cells and memory

subpopulations that participate in the immune response against the virus. We are particularly interested in the follicular helper T-cell (Tfh) and B-cell axis. This study will allow us to better understand the kinetics of vaccine-induced immunity against yellow fever and to assess whether the fractional dose, which has been widely used in risk regions, induces humoral and cellular immunological memory similar to the full dose.

Keywords: Yellow fever. Vaccine. Fractional dose. Adaptive immunity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DE TRANSMISSÃO DA FEBRE AMARELA	18
FIGURA 2 - PAÍSES E ÁREAS DE RISCO PARA TRANSMISSÃO DE FEBRE AMARELA.	19
FIGURA 3 - PRINCIPAIS ACHADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS NOS DIFERENTES ESTÁGIOS DA FEBRE AMARELA.....	20
FIGURA 4 - COBERTURA VACINAL CONTRA A FEBRE AMARELA, DE 1970 ATÉ 2016.....	28
FIGURA 5 – QUANTIFICAÇÃO DE CÓPIAS VIRAIS E DE NÍVEIS DE ANTICORPOS PRODUZIDOS APÓS A IMUNIZAÇÃO.....	40
FIGURA 6 – PERFIL DA PRODUÇÃO DE FATORES SOLÚVEIS SÉRICOS PÓS VACINAÇÃO CONTRA A FEBRE AMARELA.....	42
FIGURA 7 - ANÁLISE FENOTÍPICA DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD8+ APÓS IMUNIZAÇÃO COM A DOSE FRACIONADA DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA.....	44
FIGURA 8 - ANÁLISE FENOTÍPICA DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4+ APÓS IMUNIZAÇÃO COM A DOSE FRACIONADA DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA.....	46
FIGURA 9 - ANÁLISE FENOTÍPICA DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B CD19+ APÓS DOSE FRACIONADA DA VACINA.....	48

FIGURA 10 - PERFIL DE CONECTIVIDADE ENTRE LINFÓCITOS E FATORES SOLÚVEIS AVALIADOS.....	50
FIGURA 11 – RESUMO GRÁFICO.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

μL - Microlitro

μm – Micrometro

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

Bcl-6 - Linfoma de células B 6

BCR – Receptor de células B (*B cell receptor*)

°C – Graus centígrados

CCL – Ligante de quimiocinas CC

CCR – Receptor de quimiocinas CC

CD – *Cluster* de Diferenciação

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CMC – Carboximetilcelulose

CO₂ - Dióxido de Carbono

CTL – Linfócitos T Citotóxicos

CXCL - Ligante de quimiocinas CXC

CXCR - Receptor de quimiocinas CXC

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

ELISA - Ensaio De Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

FBS – Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FDCs – Células Dendríticas Foliculares (*Follicular Dendritic Cells*)

FGF básico - Fator de crescimento fibroblástico básico (*Fibroblast Growth Factor Basic*)

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

g- Gramas

G-CSF - Fator estimulador de colônias granulocitárias (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*)

GC – Centro germinal

GM-CSF – Fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

HLA - Antígeno leucocitário humano (*Human Leukocyte Antigen*)

ICOS - Coestimulador induzível de células T (*Inducible T-cell Costimulator*)

IFN-γ - Interferon gama

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina
IRR - Instituto René Rachou
LD₅₀ – Dose Letal 50% (Lethal Dose 50%)
M - Mol
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Main Histocompatibility Complex*)
mL – Mililitros
MLD₅₀ – Dose Letal de Camundongo 50% (*Mouse Lethal Dose 50%*)
mM - Milimolar
NK – *Natural Killer*
NKT – *T Natural Killer*
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)
PBMC – Células mononucleares de sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)
PBS – Tampão fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)
PD-1 – Morte celular programada 1
PDGF-bb – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas bb (*Platelet Derived Growth Factor bb*)
PFU – Unidade Formadora de Placa (*Plaque-Forming Unit*)
PRNT - Teste de Neutralização de Redução de Placas (*Plaque Reduction Neutralization Test*)
RNA – Ácido Ribonucleico
rpm - Rotações por minuto
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*
qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa
SEM – Erro Padrão da Média (*Standard Error of the Mean*)
TCR – Receptor de célula T (*T cell receptor*)
Tfh – Linfócitos T Foliculares Auxiliares
TGF-β - Fator de transformação do crescimento beta
Th - Linfócitos T Auxiliares (*Helper*)
TLR – Receptores do tipo Toll (*Toll-like Receptor*)
TNF - Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
Treg – Células T reguladoras
UI – Unidades Internacionais
VEGF – Fator De Crescimento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

WHO – *World Health Organization*

xg – Força G

YFV - *yellow fever virus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. A FEBRE AMARELA - HISTÓRIA E ORIGEM DO VÍRUS	16
1.2. EPIDEMIOLOGIA.....	17
1.2.1. TRANSMISSÃO.....	17
1.2.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	18
1.2.3. SINTOMAS E DIAGNÓSTICO.....	19
1.2.4. TRATAMENTO E PREVENÇÃO	21
1.3. PATOGÊNESE	22
1.4. RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA INFECÇÃO.....	23
1.5. DESENVOLVIMENTO DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA.....	24
1.6. RESPOSTA IMUNE APÓS VACINAÇÃO.....	25
1.7. RE-EMERGÊNCIA DE NOVOS SURTOS	27
1.8. DOSE FRACIONADA DA VACINA	29
1.9. A CÉLULA T CD4 ⁺ AUXILIAR FOLICULAR APÓS A IMUNIZAÇÃO.....	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1. COLETA DE SANGUE.....	34
3.2. OBTENÇÃO DE PBMC.....	34
3.3. IMUNOFENOTIPAGEM	35
3.4. QUANTIFICAÇÃO DE CARGA VIRAL.....	35
3.5. ENSAIO DE LUMINEX MULTIPLEXING.....	36
3.6. TITULAÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES.....	37
3.7. DOSAGEM DE IGG ESPECÍFICO.....	37
3.8. QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38

4. RESULTADOS	39
4.1. A DOSE FRACIONADA DA VACINA NÃO INDUZ VIREMIA SIGNIFICATIVA, MAS LEVA A PRODUÇÃO DE ALTOS NÍVEIS DE IgG E ANTICORPOS NEUTRALIZANTES VÍRUS-ESPECÍFICOS	39
4.2. A IMUNIZAÇÃO COM A DOSE FRACIONADA DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA INDUZ PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS ENVOLVIDAS NO RECRUTAMENTO DE LINFÓCITOS, E DE CITOCINAS RESPONSÁVEIS PELA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T _{fh}	40
4.3. LINFÓCITOS T CD8 ⁺ QUE EXPRESSAM MARCADORES DE ATIVAÇÃO SÃO ENCONTRADOS EM MAIORES QUANTIDADES APÓS A VACINAÇÃO.....	43
4.4. A DOSE FRACIONADA DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA INDUZ MAIOR ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ , UM AUMENTO NA QUANTIDADE DE LINFÓCITOS T _{fh} CIRCULANTES E ELEVA A PROPORÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES TH1 E TH17	44
4.5. A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS B DE MEMÓRIA CLÁSSICA SOFRE EXPANSÃO 15 DIAS APÓS A IMUNIZAÇÃO.....	47
4.6. HÁ ALTA CORRELAÇÃO DE LINFÓCITOS B COM OS FATORES SOLÚVEIS DOSADOS 30 DIAS APÓS IMUNIZAÇÃO COM A DOSE FRACIONADA DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA.....	48
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. A FEBRE AMARELA - HISTÓRIA E ORIGEM DO VÍRUS

Os primeiros relatos documentados da febre amarela foram feitos no século XVII, sendo que a primeira descrição de uma epidemia foi feita em 1648 na Península de Iucatã no México. O historiador Diego López de Cogolludo descreve uma doença, nunca vista desde a conquista das terras pelos espanhóis, que atingiu a vila de Campeche em junho de 1648 e afetou quase toda a cidade em menos de 8 dias, levando rapidamente a óbito as pessoas infectadas. Os médicos não reconheciam a doença, que causava dores de cabeça, dores no corpo e febres que provocavam delírios, sendo que alguns pacientes vomitavam sangue, outros tinham fortes diarreias, e poucos sobreviviam após 3 dias do início dos sintomas (DE COGOLLUDO, 1867)

Em seguida, a doença desconhecida se espalhou pelas Antilhas causando novas epidemias, como em Cuba em 1649 (DE LA PEZUELA, 1868), Martinica em 1653 (BÉRENGER-FÉRAUD, 1878) e Guadalupe em 1665 (DU TERTRE, 1667). A partir de 1680, essa doença passou a se espalhar pela América do Sul, causando uma epidemia de grandes proporções no Brasil em 1686 (DA ROCHA PITTA, 1730) nas cidades de Recife e Olinda, em seguida se espalhando pela Bahia. Apenas em 1750 o termo febre amarela foi utilizado pelo naturalista Griffith Hughes, ao descrever a febre que assolava a ilha de Barbados desde 1691 e atingia outros países localizados entre os Trópicos (HUGHES, 1750). Até o final do século XVII, várias epidemias de febre amarela foram relatadas na América Central, América do Sul e nas ilhas do mar do Caribe. Como todos esses relatos apontavam uma alta mortalidade, passou-se a acreditar que as populações das Américas, até então, nunca haviam sido expostos à essa enfermidade, o que refutava a teoria de que a doença havia se originado nessa região.

Nesse momento, acreditava-se que a doença desconhecida era transmitida pelo ar ou pelas águas contaminadas das novas terras recém-descobertas. No entanto, novas epidemias começaram a acontecer na Europa, com início em 1731 em Cádiz na Espanha (DE VILLALBA, 1803), se espalhando para algumas cidades de Portugal e da Inglaterra. Epidemias também foram relatadas na América do Norte, principalmente na Filadélfia em 1793 (CAREY, 1794), Nova Iorque em 1795 e Boston em 1798, ressurgindo durante o verão por alguns anos. Com isso, a teoria de transmissão por inalação ou ingestão começou a ser desacreditada.

Em 1881, o médico cubano Carlos Juan Finlay propôs que a febre amarela era transmitida pelo mosquito *Culex cubensis* (atual *Aedes aegypti*) que se alimentava de sangue de um enfermo e transmitia a doença para homens saudáveis (FINLAY, 1881). Essa teoria foi

comprovada pela Comissão de Reed, uma junta formada pelos Estados Unidos em 1899 para entender a doença que acometia seus soldados que ocupavam Cuba, na qual os médicos Walter Reed, James Carrol e Aristides Agramonte confirmaram a infecção de pessoas saudáveis com febre amarela após picada de mosquito *Aedes aegypti* que previamente se alimentou de um paciente infectado (REED; CARROLL; AGRAMONTE, 1901). A descoberta de que a doença era causada por um vírus veio alguns anos mais tarde pelo patologista Adrian Stokes em 1927, que conseguiu isolar uma cepa do vírus de um paciente em Gana (STOKES; BAUER; HUDSON, 1928b).

Entendendo melhor a forma da transmissão da doença e estudando as condições climáticas e geográficas ideais para a proliferação do mosquito vetor *Aedes aegypti*, surgiu a hipótese de que a febre amarela havia sido originada no continente Africano, que além de possuir as condições ideais para o mosquito vetor, era constituído de população negra que apresentava alta resistência à infecção pela doença, apresentando apenas sintomas leves enquanto as populações das Américas apresentavam alta mortalidade. No entanto, os relatos históricos da colonização da África são menos completos do que os das Américas, e os casos de malária no continente africano, que eram muito prevalentes e graves, dificultavam a diferenciação entre pessoas acometidas por ela e pela febre amarela (HINDLE, 1932), sendo um empecilho por muitos anos para o entendimento sobre a origem do vírus. Atualmente, estudos genéticos suportam a hipótese de que o vírus da febre amarela e o mosquito *Aedes aegypti* tiveram sua origem no oeste africano, e que ele foi introduzido nas Américas há cerca de 550 anos atrás com o comércio de escravos feito pelos Europeus (POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018; STAPLES; MONATH, 2008).

1.2. EPIDEMIOLOGIA

1.2.1. TRANSMISSÃO

Existem três tipos de ciclos de transmissão da febre amarela. O primeiro ciclo é conhecido como silvestre, no qual mosquitos hematófagos de hábitos diurnos, principalmente do gênero *Haemagogus*, transmitem o vírus entre primatas não humanos dentro das florestas tropicais. No entanto, com a invasão de humanos em áreas selvagens para realização de caçadas ou desmatamento, inicia-se um ciclo de transmissão intermediário, no qual mosquitos hematófagos semidomésticos transmitem o vírus de macacos selvagens para humanos. Por fim, os indivíduos infectados no ciclo intermediário iniciam o ciclo de transmissão urbano ao retornarem às regiões populosas que possuem mosquitos antropofílicos (*Aedes aegypti*) capazes

de transmitir o vírus entre humanos, levando ao surgimento de grandes epidemias (MONATH, 1999).

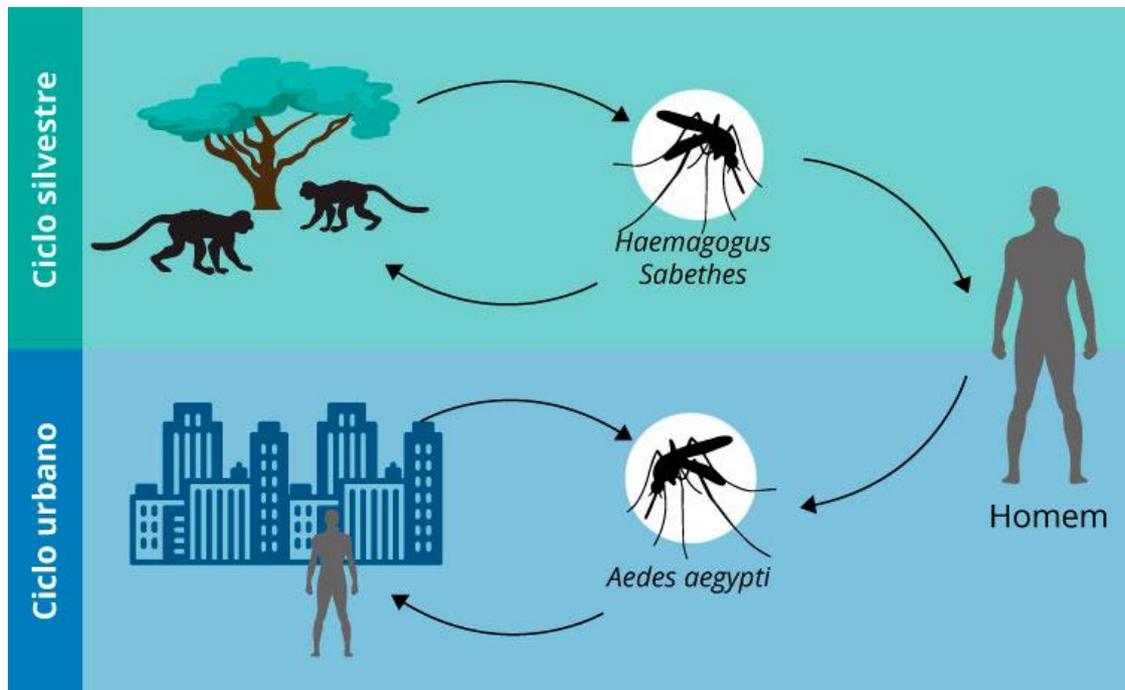


Figura 1 – Ciclos epidemiológicos de transmissão da febre amarela. Fonte: Ministério da Saúde (disponível em: [http://antigo.saude.gov.br/18aúde-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao e-prevencao](http://antigo.saude.gov.br/18aúde-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao)). Acesso em 24/11/2020.

1.2.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A febre amarela é uma doença endêmica das regiões tropicais e subtropicais da África e da América do Sul, que são as regiões com condições climáticas ideais para a proliferação dos mosquitos transmissores do vírus (NOGUCHI, 1919), além da presença de primatas não humanos que são essenciais no ciclo de transmissão da doença. Anualmente, são reportados cerca de 200 mil casos de febre amarela em todo o mundo, sendo o continente africano responsável por cerca de 90% desses casos reportados, e uma média de 30 mil mortes.

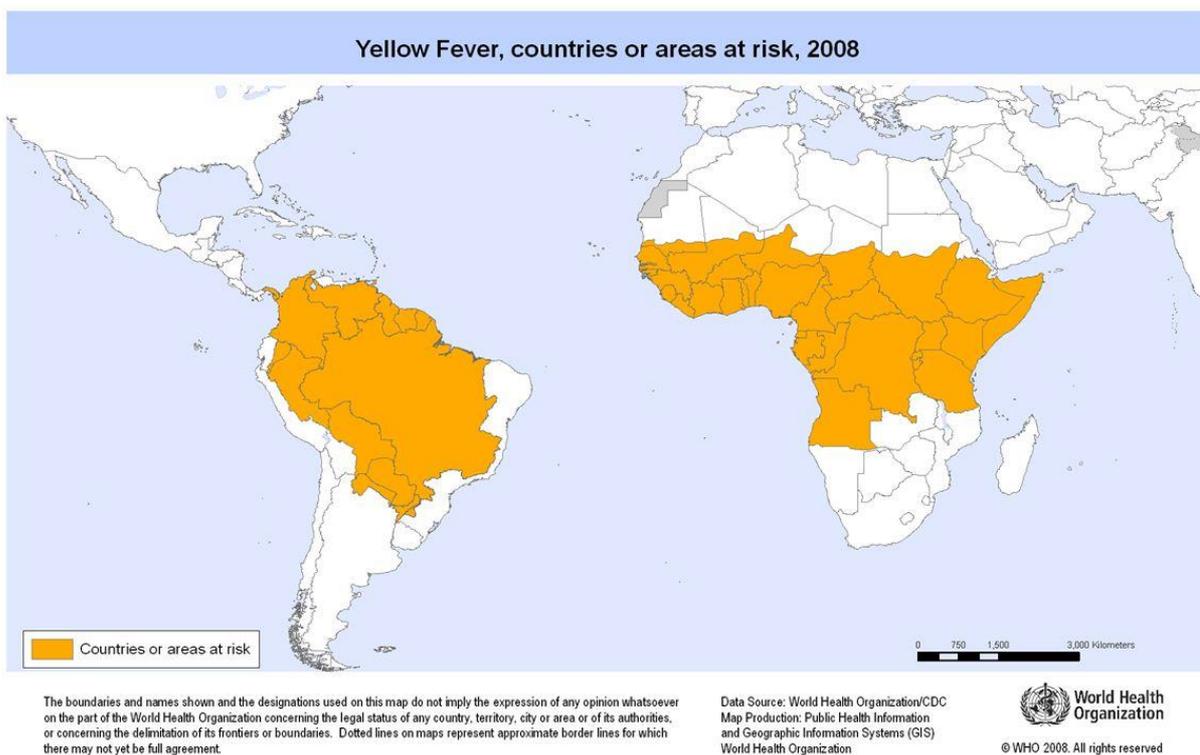


Figura 2 – Países e áreas de risco para transmissão de febre amarela. Fonte: World Health Organization (disponível em: <https://www.regentstreetclinic.co.uk/yellow-fever-vaccine-birmingham/>). Acesso em 16/02/2021.

1.2.3. SINTOMAS E DIAGNÓSTICO

O quadro clínico da doença se inicia após um período de incubação de 3 a 6 dias após a inoculação do vírus pela picada do mosquito, quando ocorre o pico da viremia, e o aparecimento de sintomas graves é repentino. Os principais sintomas são febres, dores de cabeça e musculares, náuseas, bradicardia, tonturas e prostração. Os primeiros indícios em exames laboratoriais são leucopenia e neutropenia, acompanhados de aumento da relação AST/ALT (lesão hepática) e proteinúria (lesão renal). Após esse intervalo de tempo, a doença entra em um período de remissão que dura cerca de 24h, no qual não se detecta viremia e são encontrados anticorpos no sangue. A partir dessa fase, o paciente pode resolver a infecção e se recuperar sem mais sinais ou sintomas, ou entrar no chamado período de intoxicação.

Nessa fase as lesões em órgão como fígado, rins e coração já estão avançadas, dando início a sintomas mais severos como vômitos, icterícia, oligúria ou anúria, hemorragias, hipotensão, choque e delírios, podendo o paciente inclusive entrar em coma. Os achados laboratoriais incluem trombocitopenia e leucocitose, hipoglicemia, acidose, relação AST/ALT aumentada e proteinúria. Cerca de 30% dos pacientes no período de intoxicação morrem após 7 ou 10 dias da piora dos sintomas, e os pacientes que sobrevivem precisam realizar sessões de diálise para contornar a necrose tubular renal. A última fase da doença, de convalescência, é

regida por fraqueza prolongada e fadiga extrema, além de função hepática prejudicada por longo período.

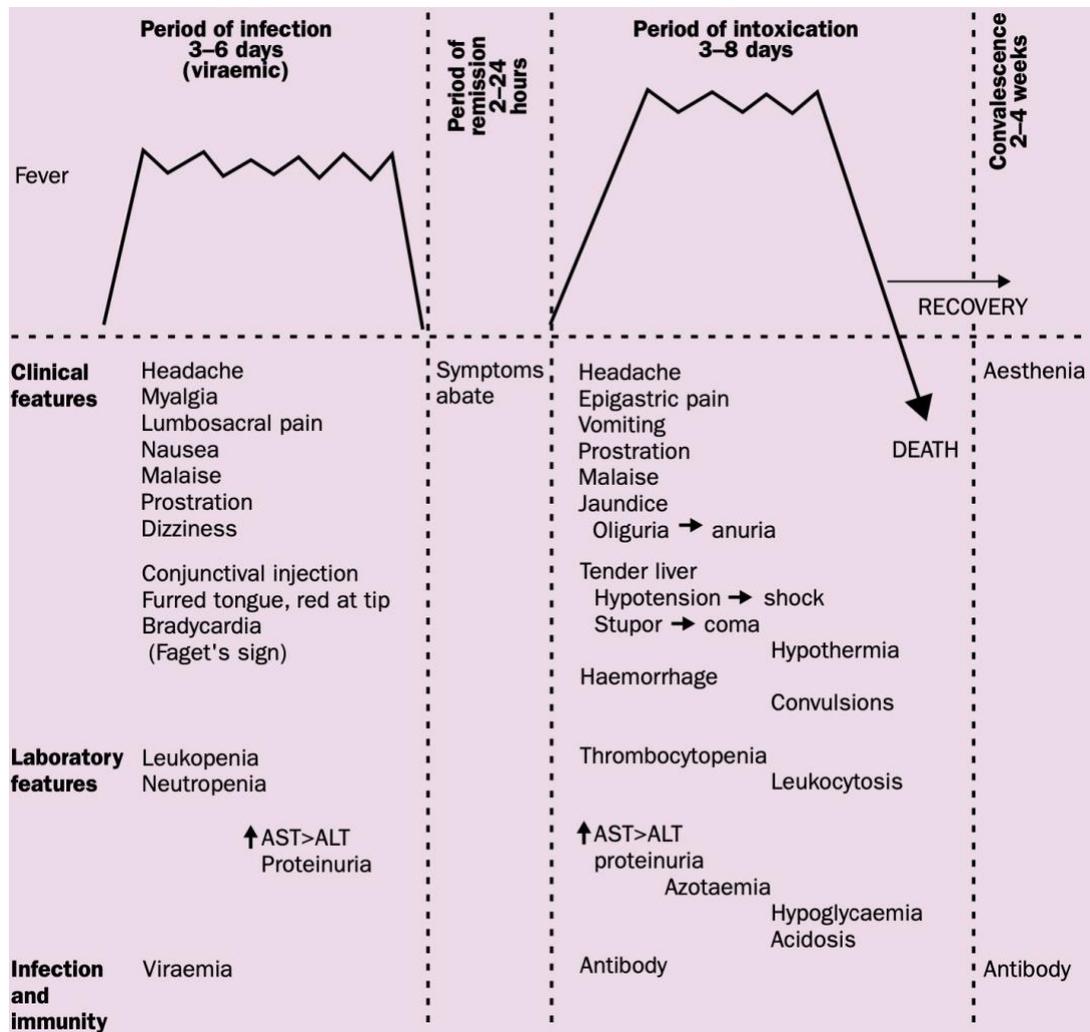


Figura 3 - Principais achados clínicos e laboratoriais nos diferentes estágios da febre amarela. Fonte: Monath, T P. "Yellow fever: an update." *The Lancet. Infectious diseases* vol. 1,1 (2001): 11-20. doi:10.1016/S1473-3099(01)00016-0. Acessado em: 01/03/2021.

Atualmente, o teste considerado mais adequado para o diagnóstico da febre amarela é a detecção de anticorpos IgM específicos para o YFV através de ELISA (MONATH; NYSTROM, 1984). No entanto, esse teste possui uma limitação importante, que é uma reação cruzada com anticorpos para outros flavivírus, principalmente do vírus da dengue (DOMINGO et al., 2018). Como o quadro clínico de dengue hemorrágica e febre amarela são parecidos, essa reação cruzada dificulta o diagnóstico preciso e atrasa o tratamento eficaz. Além disso, em casos de reinfeções por febre amarela, o IgM específico apresenta pico de produção em um período muito curto, de 2 a 3 dias após a infecção, e em títulos baixos (GIBNEY et al., 2014).

O desenvolvimento nos últimos anos de técnicas de diagnóstico moleculares com alta sensibilidade e especificidade, como qRT-PCR, foi essencial para facilitar o controle de novos

surtos, principalmente porque essas técnicas permitem diferenciar infecções causadas pelo vírus selvagem das causadas pela cepa da vacina (DOMINGO et al., 2012), devido a diferenças encontradas na sequência de nucleotídeos, principalmente nas proteínas do envelope viral, entre o vírus selvagem e as cepas atenuadas provenientes de 17D, que são as cepas utilizadas para a produção da vacina (HAHN et al., 1987). Novas técnicas também permitem a detecção do vírus em amostras de tecidos conservadas em parafina (NUNES et al., 2011), e métodos portáteis de detecção em tempo real já foram desenvolvidos para uso em locais onde não há a possibilidade de armazenamento adequado de amostras, sendo necessário realizar o teste na hora da coleta (ESCADAFAL et al., 2014). Mas mesmo com todas essas técnicas disponíveis para o diagnóstico, é essencial a realização correta da coleta da amostra e seu armazenamento adequado para permitir o isolamento do vírus, e dessa forma garantir que a caracterização da cepa seja feita de maneira precisa.

1.2.4. TRATAMENTO E PREVENÇÃO

Atualmente, terapias antivirais e imunoterapias que sejam eficazes contra a febre amarela estão em desenvolvimento para que existam tratamentos com capacidade de diminuir a alta mortalidade da doença, principalmente durante ocorrências de surtos em áreas com baixa cobertura vacinal. Estudos com imunomoduladores já foram realizados em primatas e eles mostraram eficácia no controle da tempestade de citocinas, mas apenas quando administrados rapidamente após a infecção, e a utilização de antivirais se mostrou eficaz em hamsters, mas não foram obtidos resultados promissores em primatas (MONATH, 2008). Uma das terapias mais recentes em estudo é a utilização de anticorpos IgG monoclonais desenvolvidos em laboratório chamados de TY014, produzido com o uso de células de ovário de hamster chinês, específico para um epítipo conservado na proteína do envelope (E) do vírus da febre amarela. Atualmente se encontra na fase 1 de ensaios clínicos e já demonstrou eficácia no controle da viremia induzida em pacientes imunizados com a vacina 17D-204 contra a febre amarela. De 5 pacientes que foram tratados com TY014 após a vacinação, nenhum apresentou carga viral detectável até 16 dias após a imunização com 17D-204, além de ter reduzido a resposta inflamatória causada pela infecção viral, levando a menos efeitos adversos quando comparados a indivíduos vacinados que foram tratados com placebo (LOW et al., 2020).

Enquanto formas alternativas de tratamento estão sendo estudadas, o tratamento de suporte segue sendo o mais utilizado. A reposição de fluidos para evitar hipotensão, administração de oxigênio, controle de acidose metabólica, diálise e tratamento com anticonvulsivantes e drogas vasoativas fazem parte dos procedimentos realizados em pacientes em terapia intensiva devido

a febre amarela grave (MONATH, 1987). Quanto à prevenção contra a febre amarela, a forma mais eficaz e duradoura é a vacinação, que é segura, de baixo custo e gera imunidade duradoura contra o vírus (CAMPI-AZEVEDO et al., 2019). O controle de vetores e o uso de repelentes que protejam contra a picada dos mosquitos transmissores da doença também são importantes formas de prevenção (“Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Yellow Fever”, 2019).

1.3. PATOGÊNESE

A febre amarela é uma doença viscerotrópica em humanos, e a replicação viral nos hepatócitos é essencial para o estabelecimento da doença. O vírus, presente nas glândulas salivares de mosquitos infectados, é transmitido após a picada e é endocitado por células dendríticas ou macrófagos localizados na derme, células nas quais o vírus consegue se replicar no ambiente intracelular (CONG et al., 2016), que migram para os órgãos linfoides secundários. No linfonodo, a célula infectada ativa linfócitos T e B *naïve* presentes no tecido linfoide enquanto o vírus se replica no ambiente intracelular, levando à exocitose de várias novas cópias virais que podem atingir a corrente sanguínea. A partir do sangue periférico, o vírus pode atingir diferentes órgãos, e já foram reportadas lesões significativas causadas por replicação viral seguida de lise em células do coração, baço e rins (DE BRITO et al., 1992). De forma geral, os flavivírus podem infectar as células do hospedeiro humano por endocitose mediada por receptores, por fagocitose realizada por macrófagos ou através de fusão do envelope viral com a membrana celular. Após a infecção, o vírus se replica no ambiente intracelular, e os mecanismos por trás dessa replicação ainda estão pouco elucidados, mas é sabido que a liberação de novas cópias virais é feita a partir de exocitose ou por apoptose da célula (MARIANNEAU et al., 1997), o que gera danos citopáticos. Essa replicação e maturação celular ocorre rapidamente, e a carga viral intracelular tem seu pico 24h após a entrada do vírus na célula.

No entanto, o órgão-alvo central para a ação do vírus é o fígado, onde o YFV infecta hepatócitos, realiza sucessivas replicações virais e induz apoptose celular, necrose lítica, macro e micro esteatose, que resultam em um grande dano hepático (QUARESMA et al., 2013). Essa lesão hepática grave leva a dois principais sintomas da febre amarela: a icterícia, causada pelo acúmulo de bilirrubina indireta na corrente sanguínea pois o metabolismo de bilirrubina no fígado é prejudicado, e as hemorragias causadas pela diminuição da produção hepática de vitamina K, levando a uma coagulopatia em pacientes com danos hepáticos (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Além das lesões causadas pelo vírus, a tempestade de citocinas

causada pela resposta imune contra a infecção também possui um papel importante na hepatotoxicidade da doença (TER MEULEN et al., 2004).

1.4. RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA INFECÇÃO

O vírus da febre amarela pode causar dois tipos de infecção, a infecção viscerotrópica na qual as lesões causadas pela replicação viral ocorrem em órgãos como fígado, rins, baço e coração, ou a infecção neurotrópica, na qual o cérebro é o órgão mais afetado pelo vírus. Em primatas e humanos, o vírus é predominantemente viscerotrópico, mas ao ser inoculado de maneira periférica em outras espécies, como roedores, leva a danos neurotrópicos, demonstrando uma atividade neuroinvasiva e causando encefalite nesses animais. A inoculação intracerebral em roedores também leva à danos encefálicos, o que não ocorre em primatas (MONATH; BARRETT, 2003).

Como já foi estabelecido, o fígado é o órgão mais afetado pela infecção do vírus da febre amarela. Os danos hepáticos se manifestam principalmente no período de intoxicação da doença, e em média 80% dos hepatócitos são lesados pela replicação viral seguida de apoptose (KLOTZ; BELT, 1930). Associada à apoptose de hepatócitos causadas pela replicação viral dentro dessas células, uma produção exacerbada e não regulada de citocinas pró-inflamatória por células do sistema imune em resposta à infecção viral também possui um papel importante no dano de múltiplos órgãos de indivíduos acometidos pela febre amarela (QUARESMA; DUARTE; VASCONCELOS, 2006).

Inicialmente, os corpos apoptóticos, gerados após a exocitose das novas cópias de virais dos hepatócitos, são fagocitados por macrófagos presentes no fígado e iniciam uma resposta inflamatória (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Estudos mostram que as células de Kupffer, macrófagos que residem no tecido hepático, fagocitam esses corpos gerados após apoptose de hepatócitos causada pela replicação viral intracelular, e essas células passam a produzir altos níveis da citocina pro-inflamatória TNF, que é sabidamente um importante mediador de lesão hepática (BRADHAM et al., 1998), além de passarem a expressar o marcador de morte celular Fas ligante (FasL) (CANBAY et al., 2003). Altos níveis de TNF podem induzir maior atividade citolítica de linfócitos T CD8⁺ e células T *Natural Killers* (NKT), que também são encontrados em biopsias hepáticas de pacientes que foram a óbito devido a infecção por febre amarela (QUARESMA et al., 2006), e a ação de ambas também pode ter um papel importante na apoptose de hepatócitos durante a infecção devido à indução de morte celular em hepatócitos infectados.

Biopsias hepáticas de pacientes que foram a óbito devido à infecção pela febre amarela apresentam infiltrados de linfócitos T CD4⁺ T *helper* 1 (Th1), que expressam altos níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF, sendo TNF sabidamente um importante mediador de lesão hepática. Além da resposta Th1, altos níveis da citocina TGF- β também foram detectados em biopsias hepáticas de pacientes que foram a óbito (QUARESMA et al., 2006). O TGF- β é produzido pelos macrófagos no fígado em caso de lesões hepáticas e ele possui efeitos pleiotrópicos nesse ambiente, podendo agir como citocina anti-inflamatória através do seu importante papel na inibição da diferenciação de células Th1 e indução da diferenciação de células T reguladoras (Treg) (MCGEACHY; CUA, 2007), o que diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, o TGF- β também inibe a diferenciação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, contribuindo para a diminuição da apoptose de hepatócitos infectados (LI et al., 2006)

No entanto, ao inibir a ação das principais células responsáveis pelo controle da replicação viral hepática, os linfócitos Th1 e T CD8⁺ CTL, o TGF- β permite que replicação viral ocorra sem o devido controle do sistema imune, o que eleva os níveis de lesão hepática causada pela apoptose celular após a saída de novas cópias virais dos hepatócitos, e vai em contrapartida ao efeito anti-inflamatório apresentado pelo TGF- β . Dessa forma, a resposta não balanceada de células Th1, CTL e da citocina TGF- β , que induzem a apoptose de hepatócitos pela ação de citocinas pro-inflamatórias, pela morte de células infectadas e por aumentar a permissividade da replicação viral intracelular respectivamente, contribui para a imunopatogênese da febre amarela.

1.5. DESENVOLVIMENTO DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA

Em 1927, Adrian Stokes coletou amostras de sangue de um paciente africano chamado Asibi, infectado com o vírus da febre amarela que se recuperou rapidamente da doença. Stokes iniciou experimentos com essas amostras inoculando-as em *cavia porcellus*, que não apresentaram sintomas além de uma leve reação febril, e em macacos rhesus que foram à óbito (STOKES; BAUER; HUDSON, 1928a). No entanto, eram necessários estudos com o vírus utilizando animais de laboratório com maior disponibilidade e de menor custo. Assim, em 1930, Max Theiler iniciou passagens intracerebrais com amostras de sangue retiradas de macacos rhesus em camundongos, uma vez que esses animais não eram susceptíveis ao vírus da febre amarela quando inoculado de formas convencionais. Foi visto que era possível manter uma cepa do vírus através de passagens intracerebrais entre camundongos, e que após algumas

passagens esses animais não iam a óbito pela doença. Foi visto também que após um certo número de passagens, a cepa obtida não era virulenta após inoculação subcutânea em macacos rhesus, mas que a inoculação intracerebral dessa cepa levava os macacos à óbito (THEILER, 1930). Com isso, Theiler conclui que a viscerotropia e neurotropia do vírus pode ser reduzida utilizando métodos apropriados.

Em 1932 ocorreram tentativas de cultivar a cepa neurotrópica obtida em camundongos *in vitro* utilizando diferentes tipos de tecido, e a cultura em tecidos obtidos de embriões macerados de galinha se mostrou a mais bem sucedida, pois nessas culturas o vírus apresentava uma virulência constante, testada em inoculação intracelular em camundongos após várias subculturas (HAAGEN; THEILER, 1932). Em seguida, Theiler realizou sucessivas passagens da cepa neurotrópica em tecido macerado de embriões de galinha após a retirada da cabeça e da medula espinhal para avaliar se haveria redução do neurotropismo. Foi visto que a virulência viscerotrópica e neurotrópica do vírus diminuiu drasticamente após 100 passagens, pois a inoculação intracerebral dessa cepa em macacos rhesus não causava encefalite fatal, apenas uma febre, e a inoculação subcutânea causa uma infecção generalizada leve (THEILER; SMITH, 1937a). A partir disso, a cepa obtida na 176ª passagem, denominada 17D, foi selecionada para testes de imunização.

A inoculação subcutânea de macacos rhesus com a cepa 17D levou a produção de anticorpos contra uma cepa altamente virulenta inoculada 7 dias após a imunização, e a subsequente imunização de um número pequeno humanos que não tiveram contato prévio com o vírus da febre amarela também levou a produção de anticorpos específicos contra o vírus, e sem apresentar efeitos adversos (THEILER; SMITH, 1937b). Após o desenvolvimento da vacina, iniciaram-se produções em larga escala do imunizante para a realização de testes em regiões endêmicas para a doença. Com o objetivo de evitar mutações imunogênicas na cepa utilizada para a produção da vacina, o que poderia comprometer a sua segurança, a OMS criou um lote de subcepas provenientes da cepa original 17D, chamadas 17DD e 17D-204 (e sua subcepa 17D-213) (GALLER et al., 1998), que passaram a ser utilizadas na produção de vacinas ao redor do mundo.

1.6. RESPOSTA IMUNE APÓS VACINAÇÃO

Na última década, numerosos estudos foram realizados para um melhor entendimento da resposta imune celular e humoral após a imunização contra a febre amarela. Isso se deve principalmente ao fato de a vacina ser considerada uma das mais bem sucedidas já desenvolvidas, com poucos ou nenhum efeito adverso, e com alta imunogenicidade, induzido

a produção de anticorpos neutralizantes específicos de longa duração. O entendimento da resposta gerada pela imunização contra a febre amarela pode auxiliar no desenvolvimento de novas vacinas mais eficazes para outras doenças.

Entre os dias 3 e 5 após a vacina ocorre o pico da viremia, com redução significativa da quantidade de RNA viral detectável após 7 ou 9 dias (REINHARDT et al., 1998). Simultaneamente ao pico da viremia, ocorre um pico de produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF e IL-2 (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014), produzidas principalmente por células *Natural Killer* (NK) provavelmente ativadas após o reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) pelos *Toll-like Receptors* (TLRs) 3 e 9, que são altamente expressos em células NK após a imunização e que são responsáveis pelo reconhecimento de RNA viral (DA COSTA NEVES et al., 2009). As células NK ativadas tem um importante papel na resposta inicial à vacina por realizar o controle da viremia e por auxiliar na maturação de células dendríticas. Além disso, baixos níveis de IL-10, citocina anti-inflamatória, são detectados no dia 5 após a vacina, o que permite o desenvolvimento e maturação de células apresentadoras de antígeno, que aumentam a expressão de Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) (MOCELLIN et al., 2003).

No dia 7 após a vacinação, macrófagos e neutrófilos ativados estão presentes em maiores quantidades, ambos produzindo altos níveis de TNF e IL-12 (LUIZA-SILVA et al., 2011), sendo a última responsável pela diferenciação e proliferação de Linfócitos T CD4⁺ Th1 (JACOBSON et al., 1995). Como esperado, devido a presença de IL-12, a subpopulação de células Th1 se apresentou aumentada no dia 7, e expressando o marcador de ativação tardia HLA-DR, no entanto ocorre simultaneamente uma resposta modulatória do sistema imune, pois no dia 7 também é encontrado um aumento na população de células T reguladoras (Treg) expressando altos níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , que podem ser responsáveis pela redução de células NK ativadas nesse dia. Linfócitos T CD8⁺ expressando os marcadores de ativação CD69⁺ e CD38⁺ também se mostraram aumentados 7 dias após a imunização (MARTINS et al., 2007).

Quinze dias após a imunização, observa-se um aumento na quantidade de linfócitos B ativados (CD19⁺ CD69⁺) circulantes e um maior número de linfócitos B que expressam IL-10R, o receptor de IL-10, sendo essa citocina importante no aumento da viabilidade de linfócitos B do centro germinal (GC) que se diferenciam em células B de memória e plasmócitos ativados (LEVY; BROUET, 1994). Nesse período também ocorre o pico da secreção de IgM contra o vírus da febre amarela e se inicia a secreção de anticorpos neutralizantes (AKONDY et al., 2009). As células T CD4⁺ e CD8⁺ que expressam IL-10R

também estão presentes em maior quantidade no dia 15 após a imunização, e isso pode explicar a redução no número de linfócitos T ativados e específicos contra o vírus da febre amarela que ocorre nesse dia (DE WAAL MALEFYT et al., 1991a). Por fim, no dia 30 após a vacinação é observado o aumento na quantidade de linfócitos T de memória circulantes (BLOM et al., 2013), o pico da produção de citocinas anti-inflamatórias, além do aumento significativa de linfócitos B de memória clássica (CAMPI-AZEVEDO et al., 2016).

1.7. RE-EMERGÊNCIA DE NOVOS SURTOS

Após a descoberta da vacina, numerosas campanhas de vacinação foram feitas com o objetivo de reduzir os surtos de febre amarela que ocorriam com frequência na África e na América do Sul. Contudo, com o passar dos anos, a cobertura vacinal em regiões endêmicas foi reduzindo a medida em que houve queda nos casos reportados da doença. Estudos mostram que a cobertura vacinal em regiões endêmicas apresentou queda substancial entre as décadas de 80 e os anos 2000, atingindo altos níveis novamente apenas em 2010 (SHEARER et al., 2017). No entanto, estima-se que atualmente uma média de 430 milhões de pessoas (cerca de 50% de pessoas que vivem em regiões de risco) ainda precisam ser vacinadas contra a febre amarela com o objetivo de imunizar 80% de população, que é o recomendado pela OMS para atingir a imunidade de rebanho.

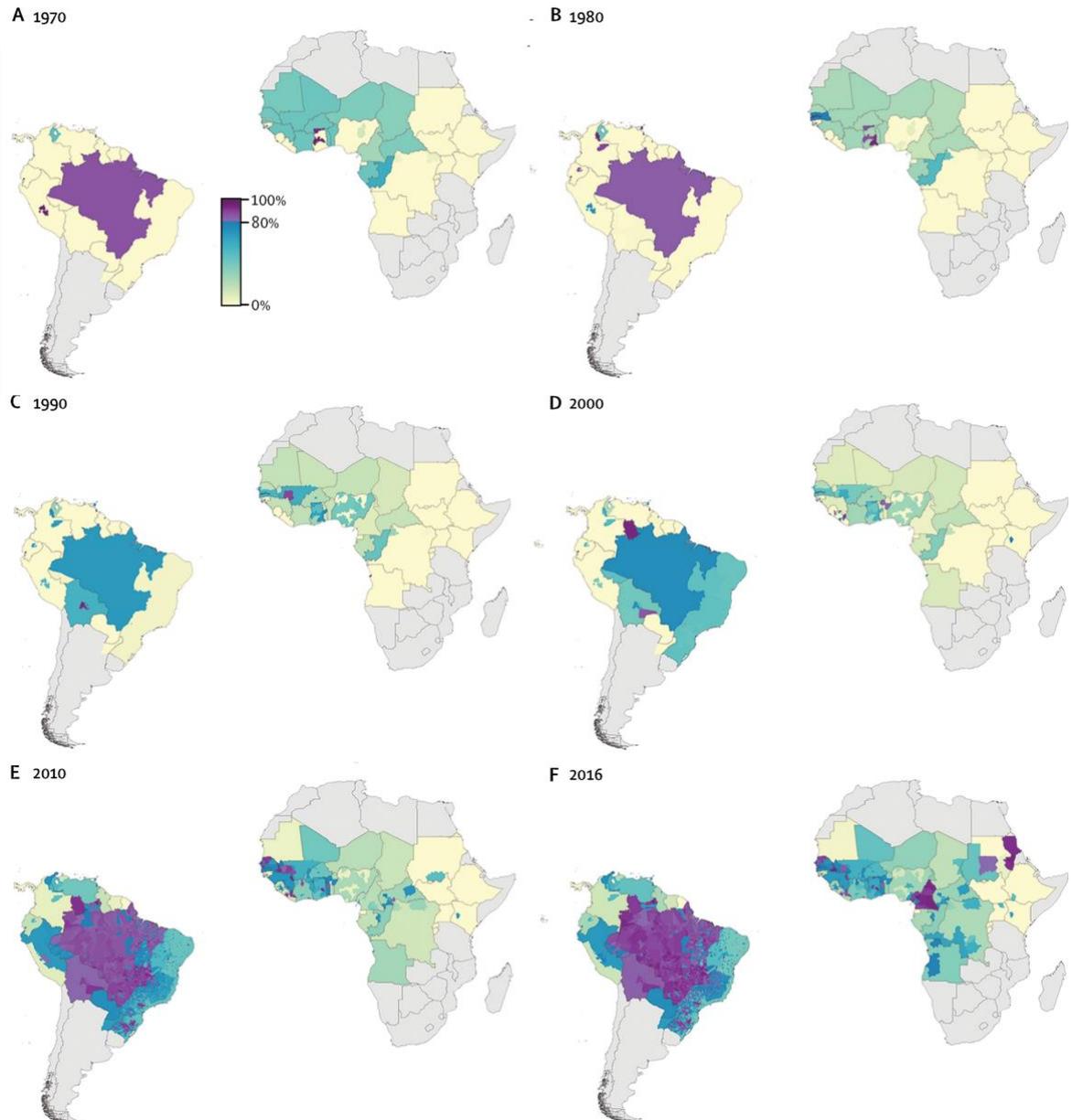


Figura 4 - Cobertura vacinal contra a febre amarela, de 1970 até 2016. Fonte: Shearer, Freya M et al. “Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis.” *The Lancet. Infectious diseases* vol. 17,11 (2017): 1209 1217.

Com isso, nos últimos 5 anos, novos surtos de grandes proporções voltaram a ocorrer em países Africanos e na América do Sul (AHMED; MEMISH, 2017; ORTIZ-MARTÍNEZ; PATIÑO-BARBOSA; RODRIGUEZ-MORALES, 2017), e de forma preocupante esses surtos vieram acompanhados de grande quantidade de casos de febre amarela em regiões antes consideradas não endêmicas, o que sugere que o vírus da febre amarela pode estar sendo introduzido em áreas com baixa ou nenhuma cobertura vacinal (DOUAM; PLOSS, 2018).

Entre dezembro de 2016 e abril de 2018, um surto de grandes proporções ocorreu no Brasil com 1900 casos confirmados de febre amarela, com uma taxa de mortalidade de

aproximadamente 35%. Os casos foram notificados principalmente nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, locais previamente considerados não endêmicos para a febre amarela, e com ocorrência de infecções de primatas nessas regiões. Estudos demonstraram que esse surto foi causado por transmissões do ciclo selvagem, onde primatas infectados habitavam regiões arborizadas nas proximidades das cidades no interior dos estados. Essas cidades mais afetadas eram consideradas pelas OMS como tendo uma cobertura vacinal de acima de 80% da população, que o limite mínimo recomendado para atingir a imunidade de rebanho (FARIA et al., 2018). Estudos evolutivos indicam que o vírus circulou silenciosamente em primatas da região sudeste, e que ele provavelmente foi introduzido nessa região vindo do Centro Oeste, devido ao ancestral comum mais próximo que data de 2015, coincidindo com uma emergência de febre amarela em Goiás (REZENDE et al., 2018). Esses dados indicam que a necessidade de uma vigilância epidemiológica de humanos e primatas mais eficaz para a rápida detecção e contenção de novos surtos de febre amarela, além de um maior controle da cobertura vacinal, mesmo em regiões consideradas de baixo risco para a doença.

Para conter esses novos surtos, a OMS criou uma estratégia global para eliminar as epidemias de febre amarela (“WHO - EYE Strategy”, 2016) até o ano de 2026. O primeiro passo é a imunização em massa de populações em áreas de risco, o que criou uma demanda de 1,4 bilhões de doses que serão utilizadas em campanhas de vacinação em massa na África, América Latina, Caribe e Brasil (“WHO- Global Strategy to Eliminate Yellow fever Epidemics (EYE)”, 2016).

1.8. DOSE FRACIONADA DA VACINA

Com o aumento na demanda por doses da vacina contra a febre amarela, a fim de aumentar a cobertura vacinal em regiões onde estavam ocorrendo grandes surtos, os estoques globais estavam se esgotando rapidamente. A forma de produção da vacina não foi muito otimizada desde que se iniciou em 1937, ainda sendo produzidas cerca de 300 doses da vacina após 12 dias de infecção de embriões de galinha com a cepa atenuada do vírus (VISSER, 2019), e os ovos utilizados devem ser livre de patógenos específicos, cuja disponibilidade é limitada, para que a segurança da vacina não seja comprometida (FREIRE et al., 2005). Além disso, apenas quatro instituições no mundo possuem qualificação da OMS para distribuir vacinas contra a febre amarela, sendo elas: Bio-Manguinhos (Brasil), Sanofi Pasteur (França), Instituto Pasteur (Senegal) e Instituto Chumakov (Rússia). Dessa forma, a reposição dos estoques não estava ocorrendo em uma velocidade satisfatória.

Para minimizar esse problema de escassez de vacinas, a OMS revisou alguns estudos publicados nos últimos anos que demonstravam que a imunização com doses fracionadas da vacina contra a febre amarela também era capaz de induzir resposta humoral e produção de citocinas de forma muito similar à resposta induzida pela dose plena (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014; DE SOUZA LOPES; DE ALMEIDA GUIMARÃES; DE CARVALHO, 1988; MARTINS et al., 2013; ROUKENS et al., 2008). Como esses estudos também demonstraram que a aplicação de doses fracionadas da vacina não causava efeitos adversos nos pacientes, a OMS recomendou o início de campanhas de vacinação em massa utilizando 1/5 da dose plena normalmente utilizada, sendo essa dose fracionada escolhida por ser a menor quantidade que pode ser administrada pelas seringas utilizadas na vacinação, e que gera uma cinética de resposta similar à induzida pela dose plena.

Assim, em 2018 foram iniciadas as imunizações com a Dose Fracionada no território brasileiro visando imunizar milhões de pessoas (CALLENDER, 2019), e o mesmo foi feito em diversos países do continente Africano (GULLAND, 2016). No entanto, a OMS ressalta que o uso da dose fracionada deve ser interrompido quando a situação de reposição das vacinas for normalizada, e o uso da dose plena deverá ser retomado.

1.9. A CÉLULA T CD4⁺ AUXILIAR FOLICULAR APÓS A IMUNIZAÇÃO

As células T CD4⁺ auxiliares foliculares foram descritas após a descoberta de uma população discreta de linfócitos T CD4⁺ foliculares que expressavam altos níveis de CXCR5, marcador de endereçamento para folículos linfoides, após imunização contra doenças (ANSEL et al., 1999). O estudo dessas células, presentes em folículos linfoides e que auxiliavam na proliferação de linfócitos B de memória de alta afinidade e de plasmócitos ativados de longa duração, mostrou uma assinatura molecular muito diferente das de células T CD4⁺ auxiliares Th1, Th2 e Th17 (CHTANOVA et al., 2004).

Foi visto uma alta expressão de ICOS (HUTLOFF et al., 1999), que é um marcador de superfície com papel importante na coestimulação de células T foliculares auxiliares através da sua interação com seu ligante ICOSL expressos por linfócitos B na borda T-B do folículo, e foi visto que essas células fazem secreção moderada de IL-10 (LÖHNING et al., 2003), tendo essa citocina a função de induzir a diferenciação de linfócitos B em plasmablastos (LAIDLAW et al., 2017). O marcador PD-1 também é altamente expresso por células Tfh, e sua principal função é controlar o posicionamento adequado e as funções auxiliares das células Tfh, fazendo com que ele desempenhe um papel essencial durante a resposta do centro germinativo (SHI et al., 2018)

As células Tfh expressam o marcador CXCR5, que permite sua migração para os folículos de linfócitos B nos órgãos linfoides secundários em resposta ao seu ligante específico CXCL13, produzido por células dendríticas foliculares (FDCs) (WANG et al., 2011) e por linfócitos T CD4⁺ CXCR5⁺ localizados no centro germinal (RASHEED et al., 2006). Dessa forma, CXCL13 pode ser visto como marcador de atividade do centro germinal, e seu uso como biomarcador de magnitude de resposta humoral vem sendo estudado (HAVENAR-DAUGHTON et al., 2016). Em seguida, foi descoberto que o fator de transcrição Bcl-6 é essencial para o direcionamento de diferenciação em células Tfh (YU et al., 2009), que as citocinas IL-6 e IL-21 tem papel importante na diferenciação, proliferação e manutenção dessas células (NURIEVA et al., 2008). Além disso, as células Tfh podem expressar também CD45RO, uma marcador de células de memória (ZHOU et al., 2014).

Morita et al. demonstrou que os linfócitos Tfh podem se dividir em 3 subpopulações de linfócitos auxiliares, Th1, Th2 e Th17, e cada uma dessas subclasses desempenha um papel diferente. As células Tfh Th2 e Th17 induzem células B *naïve* a produzirem anticorpos através da secreção de IL-21, mas Th2 promove secreção de IgG e IgE, enquanto Th17 promove a secreção de IgG e IgA. Em contrapartida, as células Tfh Th1 não foram capazes de induzir produção de anticorpos por células B *naïve*. Esses dados sugerem que diferentes subpopulações auxiliares de Tfh induzem resposta humorais muito diferentes (MORITA et al., 2011).

Estudos realizados com indivíduos saudáveis, uma coorte de adultos e uma coorte de crianças imunizados com vacina trivalente contra o vírus influenza em 2009/2010 e 2010/2011 respectivamente, correlacionaram a população de linfócitos Tfh CXCR3⁺, produtores de IFN- γ , com a produção de anticorpos específicos após estimulação de linfócitos B. Os autores discutem que as células Tfh CXCR3⁺ se elevam no sangue 7 dias após a imunização, e esse aumento se correlacionou positivamente não com a produção de novos anticorpos, mas com o aumento na quantidade de anticorpos pré-existentes, e corroborando com esse achado, ensaios *in vitro* mostraram que essas células produtoras de IFN- γ foram capazes de induzir a diferenciação de células B de memória em plasmócitos ativadas, mas que não foram capazes de auxiliar linfócitos B *naïve*. Esses resultados apontam que as células Tfh CXCR3⁺ são responsáveis pela reativação de células B de memória (BENTEBIBEL et al., 2013), e o pico dessas células e de plasmablastos no sangue ocorre 7 dias após a imunização contra o vírus influenza, o que sugere que a cinética de proliferação dessas duas células seja similar (WRAMMERT et al., 2008)

Já foi descrito que, após a imunização com a dose plena da vacina contra a febre amarela, a frequência de células Tfh aumentava após 3 dias, com pico 14 dias após a vacinação, a

polarização dessas células para a subpopulação Tfh Th1 era predominante quando comparada as outras subpopulações (Tfh Th2 e Tfh Th17) e a correlação entre essas células Tfh Th1 e a afinidade dos anticorpos neutralizantes produzidos após a imunização foi positiva (HUBER et al., 2020). No entanto, pouco se sabe sobre a ação da dose fracionada da vacina contra a febre amarela nessa população de células, que possui papel fundamental na indução de resposta humoral específica e de alta afinidade.

2. OBJETIVOS

Avaliar o impacto da imunização com a vacina antiamarílica em sua dose fracionada na resposta imune adaptativa.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar a produção de fatores solúveis por voluntários imunizados com a dose fracionada da vacina antiamarílica.
- II. Avaliar o impacto da vacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica:
 - na ativação de populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ e seus compartimentos de memória;
 - na proporção de células T CD4⁺CXCR5⁺ circulantes e no padrão de expressão de receptores de ativação e regulação envolvidos na identificação e função das células Tfh (ICOS e PD-1);
 - na proporção de células B e alterações das suas subpopulações de células *naïve*, efectoras e de memória.
- III. Avaliar a produção de IgM, IgG totais e anticorpos neutralizantes, específicos para o vírus da febre amarela induzida pela vacinação.
- IV. Realizar análises integradas dos dados gerados das amostras dos voluntários avaliados na execução dos objetivos acima, correlacionando, entre outros, populações de linfócitos B e produção de anticorpos com as subpopulações de células Tfh induzidos pela vacinação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. COLETA DE SANGUE

Os participantes do estudo foram selecionados dentro da população que participou da campanha de vacinação contra a febre amarela no estado de São Paulo, que ocorreu de janeiro a julho de 2018 nos postos de saúde de cidades da região metropolitana da capital utilizando a dose fracionada. Com aprovação do Comitê de Ética, (CAAE: 82357718.5.0000.509; Número do Parecer: 4.030.110) foram feitas coletas de sangue utilizando o tubo BD Vacutainer® SST™ II Advance, que contém um ativador de coágulo em sua parede e um gel separador que permite a obtenção do soro após centrifugação. Essas amostras foram enviadas para o Laboratório de Investigação Médica da Universidade de São Paulo (USP), onde foram processadas para separação e coleta do soro. Em seguida, o coágulo e o soro resultante foram encaminhados para o Instituto René Rachou (IRR – Fiocruz Minas), onde prosseguimos com os experimentos.

3.2. OBTENÇÃO DE PBMC

Os coágulos obtidos após o processamento das amostras de sangue foram utilizados para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Primeiramente cortamos os coágulos em fatias de 1-2 mm, e em seguida acoplamos filtros de 100 µm (Cell Strainer, BD) em tubos do tipo Falcon (Sarstedt) de 50 mL e maceramos os coágulos individualmente através desses filtros, utilizando êmbolos de seringa estéril e meio RPMI 1640 (Gibco). Adicionamos meio RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco™) aos tubos de 50 mL para obtenção de volume final de 10 mL. Em seguida, aplicamos essa suspensão lentamente em 5 mL de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare), densidade 1.077 g/mL à temperatura ambiente, com auxílio de pipeta sorológica (Sarstedt) de 10 mL. Centrifugamos os gradientes a 410 x g por 40 minutos à 20°C para a separação das PBMC, e em seguida transferimos os anéis contendo as PBMC para tubos tipo Falcon de 50 mL, no qual acrescentamos meio RPMI suplementado estéril até o volume final de 15 mL. Homogeneizamos suavemente por inversão e centrifugamos a 300 x g por 7 minutos à 4 °C para lavagem das células.

Após verter o sobrenadante do lavado de PBMC, adicionamos solução de cloreto de amônio 1x (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM e EDTA 0.1 mM - SIGMA, pH 7,2.) com o objetivo de lisar hemácias contaminantes. Em seguida homogeneizamos as suspensões vigorosamente por inversão, as incubamos por 10 minutos à temperatura ambiente, centrifugamos a 300 x g por 7 minutos à 4 °C e removemos o sobrenadante por inversão. Para lavar o pellet de PBMC,

adicionamos 40 mL de RPMI, homogeneizamos as células suavemente por inversão e as centrifugamos novamente a 300 x g por 7 minutos à 4 °C. Por fim, retiramos o sobrenadante por inversão e com o auxílio de uma pipeta de 1000 µL, e adicionamos um mililitro de RPMI para a contagem de células viáveis, para a qual utilizamos azul de Trypan (*Trypan Blue* 0,4%, Gibco) e o contador automático *Countess Automated Cell Counter* (Invitrogen).

3.3. IMUNOFENOTIPAGEM

Para realizar a fenotipagem celular, incubamos as PBMC provenientes dos coágulos de indivíduos antes da vacinação e imunizados com anticorpos monoclonais a fim de analisar as subpopulações de linfócitos T e B de interesse. Em média, obtínhamos em cada coágulo 1×10^6 células vivas ressuspendidas em 200 µL de PBS estéril, e as pipetamos em placas de 96 poços. Em seguida centrifugamos a placa por 5 minutos a 300 x g e temperatura ambiente, e vertemos a placa para descartar os sobrenadantes.

Preparamos a mistura de anticorpos dos painéis de linfócitos T e B. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD3-Qdot655, anti-CD4-BV605, anti-CD8-Alx488, anti-CD45RO-BV421, anti-CXCR6, anti-CXCR3-PE, anti-CCR6-PE-Cy5, anti-ICOS-PE-Cy7, anti-PD-1-APC, anti-CD19-PE-Cy7, anti-CD20-BV650, anti-CD21-FITC, anti-CD38-PE, anti-CD27-APC-H7 e anti-IgD-Alx700. Centrifugamos essa mistura a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C para remover agregados de anticorpos ou fluorocromos e adicionamos 50 µL da mistura de anticorpos a cada poço contendo as células. Incubamos a placa por 20 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, adicionamos 100 µL de PBS a cada poço e centrifugamos por 5 minutos a 300 x g e temperatura ambiente. Após vertermos a placa para a retirada dos sobrenadantes, nós ressuspendemos as células marcadas em 200 µL de PBS. Por fim, adquirimos as células no citômetro de fluxo FACS LSR Fortessa (BD) e os resultados foram analisados com o FlowJo V10.6.2 (Tree Star). Para as representações gráficas, utilizamos o GraphPad Prism V8.0 (GraphPad-Software).

3.4. QUANTIFICAÇÃO DE CARGA VIRAL

A quantificação de cópias virais no soro coletado de pacientes após a imunização com a dose fracionada da vacina contra a febre amarela foi feita por qRT-PCR (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR), e esse ensaio foi realizado pelo Laboratório de Vírus (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG). Submetemos um total de 140 µL de soro para extração de RNA usando um kit QIAmp Viral RNA Mini (Qiagen, Germantown, MD, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Extraímos o RNA em lotes compostos por no

máximo dez amostras mais um controle de extração negativo (água ultrapura), e testamos todas as amostras para controle endógeno (gene que codifica para β -actina, primer forward 5' CCA ACC GCG AGA TGA 3' e primer reverse 5' CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG 3') através de uma Reação em Cadeia da Polimerase - Transcriptase Reversa quantitativa (qRT-PCR) de uma etapa e um kit GoTaq® Probe 1-Step qRT-PCR System (Promega Corporation).

Através de ensaios de qRT-PCR, utilizamos como alvo YFV 5'-UTR, uma sequência de 120 nucleotídeos constante no genoma do vírus da febre amarela. Para a triagem molecular de YFV, incluímos controles negativos (água ultrapura) e positivos (RNA genômico da cepa viral YFV-17DD). Para isso, adicionamos 2,5 μ L de RNA e 5 pmol de cada primer a 5 μ L de master mix (Promega Corporation) em um volume final de 10 μ L, e realizamos a amplificação em Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Systems nas seguintes condições: transcrição reversa a 45°C por 15 min, desnaturação a 95°C por 2 min e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos seguidos de 60°C por 60 segundos.

3.5. ENSAIO DE LUMINEX MULTIPLEXING

Um ensaio de microesferas 27-plex de alto desempenho (Bio-Rad) foi empregado para detecção e quantificação de vários fatores solúveis nas amostras de soro, incluindo: CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CCL11 (Eotaxina), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP1 β), CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-17, IL-1Ra (antagonista do receptor IL-1), IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15, FGF básico, PDGF, VEGF, G-CSF e GM-CSF. Para isso, primeiramente deixamos os reagentes atingir temperatura ambiente e descongelamos as alíquotas de soro de cada paciente. Adicionamos à placa de 96 poços, contida no kit, 50 μ L das esferas reconstituídas, e lavamos a placa 2 vezes na lavadora automática Bio-Plex Pro Wash Station.

Centrifugamos as amostras de soro por 5 minutos a 14.000 x g, e pipetamos em duplicata 50 μ L de cada amostra para a placa de 96 poços fornecida no kit. O padrão reconstituído foi diluído 8 vezes e todas essas diluições também foram pipetadas (50 μ L) em duplicata na placa. O branco, que consiste no diluente contido no kit, também foi pipetado (50 μ L) em duplicata. Em seguida, homogeneizamos a placa em no Agitador Orbital para Placas de ELISA (Nova Instruments) por aproximadamente 16 horas a 500rpm e 4°C.

No dia seguinte, lavamos a placa 3 vezes, adicionamos 25 μ L do anticorpo de detecção e homogeneizamos a placa por 1 hora a 500 rpm e temperatura ambiente. Em seguida, lavamos a placa 3 vezes novamente, e acrescentamos 50 μ L de Estreptavidina-PE. Após 30 minutos de homogeneização 500rpm e temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada 3 vezes e

ressuspendida em 125 μ L de tampão de corrida e homogeneizada por mais 10 minutos a 500rpm em temperatura ambiente. Finalmente, as amostras foram testadas no equipamento Bio-Plex 200 (Bio-Rad) de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis séricos de IL-15 e GM-CSF estavam abaixo da detecção limites em várias amostras e foram excluídos de análise. Os resultados foram expressos em *Baseline Fold Change*.

3.6. TITULAÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES

A titulação dos anticorpos neutralizantes contra o vírus da febre amarela foi realizada no Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos (LATEV, Fiocruz) utilizando o Teste de Neutralização por Redução de microplaca (microPRNT₅₀) cujo protocolo foi descrito em 2012 (SIMÕES et al., 2012). Conduzimos o teste em diluições seriadas de 2 vezes começando em 1:5, em volumes de 50 μ L de amostras de soro inativadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços. Após as diluições seriadas, adicionamos trinta unidades formadoras de placas (pfu) do vírus da febre amarela em 50 μ L em todos os poços, e incluímos uma amostra de soro positiva contendo anticorpos contra o vírus da febre amarela calibrada por uma Preparação de Referência Internacional da OMS em cada teste. Na etapa de neutralização, incubamos a mistura (vírus mais soro) por 1 h em temperatura ambiente. Após esta incubação, adicionamos 50 mL de uma suspensão de células Vero em meio 199 a todos os poços e as placas incubadas novamente a 37°C em incubadora DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 3 h. Após esse período, descartamos o meio e o substituímos por meio 199 contendo 3% de carboximetilcelulose (CMC) em volumes de 100 mL. Após incubação a 37°C em 5% de CO₂ por seis dias, fixamos as monocamadas com formalina (10%), coramos com cristal violeta (0,04%) e contamos as placas com uma ampliação de 12,5x em um projetor de 35 mm montado verticalmente com lente grande angular. O título de PRNT foi definido como o equivalente à última diluição de soro que reduziu o número de placas em 50%. O *endpoint* de 50% (EP50) do teste foi determinado pela multiplicação da média aritmética do número de placas correspondentes ao soro controle por 0,5, e a diluição dos soros testados que reduziu o número de placas em 50% foi calculada por regressão linear. A linha de base foi calculada na menor diluição de soro (1:5), pois corresponde ao limite de detecção do teste, e o ponto de corte definido pelo teste foi de 1:100.

3.7. DOSAGEM DE IGG ESPECÍFICO

A dosagem de anticorpos IgG específicos para o vírus da febre amarela foi feita através de ensaios de ELISA, utilizando soro coletado dos pacientes imunizados com a dose fracionada

da vacina contra a febre amarela. Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Tecnologia Imunológica (LATIM), Bio-Manguinhos (Fiocruz/RJ). Revestimos uma placa de 96 poços com 2,5 µg/mL da cepa viral YFV-17DD diluído em 50 µL/poço de tampão de revestimento (tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6) e a incubamos durante a noite a 4°C. Em seguida, lavamos a placa mecanicamente cinco vezes com 300 µL/poço usando tampão de lavagem (PBS pH 7,4 com 0,05% Tween-20 –PBS/T). Todas as etapas de lavagem subsequentes foram realizadas como descrito acima. A placa foi então bloqueada com 100 µL/poço usando solução de bloqueio/diluyente (BDS) (PBS / T, BSA 0,05%, soro fetal bovino a 3% (FBS) e leite desnatado 5%), por 1h a 37 ° C. Diluímos as amostras de soro em 1:20 e depois as diluímos em série duas vezes até 1:160. Para a curva padrão, diluímos o anticorpo anti-febre amarela (YF - NIBSC) em diluições seriadas de duas vezes usando BDS, variando de 1 a 0,015 UI/mL. Após 1 h em temperatura ambiente, lavamos e incubamos a placa com 100 µL/poço com anticorpo comercial HRP Anti-Human IgG (BD Bioscience), diluído 1: 3000 em BDS, por 1 hora em temperatura ambiente. Lavamos a placa e adicionamos 100 µL/poço de solução de substrato (TMB mais TM). Após mais 15 min de incubação em temperatura ambiente, adicionamos 100 µL/poço de solução de parada (2M H2SO4). Realizamos a leitura em 450 nm usando espectrômetro. As absorbâncias das diluições da amostra de soro foram representadas graficamente na curva padrão. Os títulos de anticorpos foram calculados no software SoftMax Pro® por regressão logística para quatro parâmetros e expressos em UI/mL, em relação ao antissoro de referência.

3.8. QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas foram calculadas utilizando o GraphPad Prism V8.0 (GraphPad-Software). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4. RESULTADOS

4.1. A DOSE FRACIONADA DA VACINA NÃO INDUZ VIREMIA SIGNIFICATIVA, MAS LEVA A PRODUÇÃO DE ALTOS NÍVEIS DE IgG E ANTICORPOS NEUTRALIZANTES VÍRUS-ESPECÍFICOS

Com o objetivo de avaliar a viremia induzida pela dose fracionada da vacina contra a febre amarela, foram realizados ensaios de qRT-PCR para quantificar cópias virais no soro de voluntários imunizados, utilizando amostras coletadas nos dias 7 e entre os dias 10 e 15 após a vacinação. Sabe-se que a viremia induzida pela vacina contra febre amarela atinge o pico aproximadamente 5 dias após a imunização e apresenta queda nos dias subsequentes, com desaparecimento de cópias virais até o dia 15. Apenas 5 voluntários apresentaram carga viral detectável 7 dias após a imunização, e apenas 2 voluntários apresentaram carga viral detectável após 15 dias (Figura 5A).

Em seguida, para avaliar a quantidade de anticorpos IgG específicos contra o vírus da febre amarela produzidos após a vacinação, foram realizados ensaios de ELISA utilizando diferentes diluições dos soros dos voluntários. Sabe-se que o início da produção de IgG específico varia nas populações estudadas, podendo ter início 14 dias após a infecção ou imunização, ou iniciando mais tardiamente após 30 dias. Nossos resultados mostram que alguns voluntários produzem IgG específico, ainda que em baixos níveis, entre os dias 11 e 15 após a imunização. Já entre os dias 30 e 45 após a vacinação, é possível visualizar altos títulos de anticorpos IgG específicos contra o vírus da febre amarela (Figura 5B).

Finalmente, a titulação de anticorpos neutralizantes específicos contra o vírus da febre amarela foi feita utilizando-se o ensaio de MicroPRNT₅₀, como descrito em Materiais e Métodos. O teste determina que os resultados positivos são aqueles cuja titulação seja maior ou igual a diluição de 1:100. É possível observar que entre os dias 7 e 10 após a imunização, cerca de 15% (4/28) dos pacientes já apresentam soroconversão, e que 100% dos pacientes analisados soroconvertem entre 30 e 45 dias após a imunização (Figura 5C). Em conjunto, esses dados sugerem que a dose fracionada induz uma resposta humoral vírus-específica até aproximadamente um mês após a imunização.

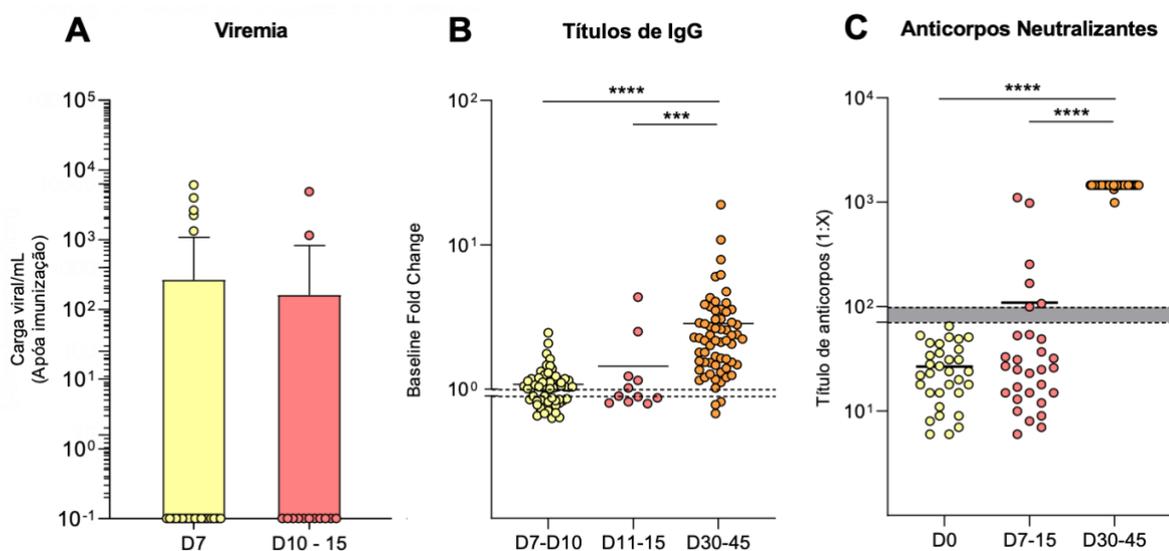


Figura 5 – Quantificação de cópias virais e de níveis de anticorpos produzidos após a imunização. (A) Avaliação de viremia induzida pela imunização com a dose fracionada da vacina contra a febre amarela através da quantificação de cópias virais por qRT-PCR. Resultado expresso em cópias/mL. (B) Títulos de anticorpos IgG específicos produzidos contra o vírus da febre amarela após imunização, avaliados por ensaio de ELISA. Resultado expresso em *Baseline Fold Change*, calculado a partir da razão entre os valores obtidos em UI/mL nos dias avaliados dividido pelo valor do mesmo indivíduo antes da vacinação. ** $p < 0.01$, **** $p < 0,0001$.

4.2. A IMUNIZAÇÃO COM A DOSE FRACIONADA DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA INDUZ PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS ENVOLVIDAS NO RECRUTAMENTO DE LINFÓCITOS, E DE CITOCINAS RESPONSÁVEIS PELA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS T_{fh}

Para avaliar a indução da produção de fatores solúveis pela imunização com a dose fracionada da vacina contra a febre amarela, quantificamos quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento nos soros coletados nos dias 7, 10 a 15 e 30 a 45 após a vacinação. Os resultados em pg/mL obtidos nesses dias foram divididos pelos valores obtidos no dia 0 do mesmo indivíduo, valor basal prévio à imunização. Dessa forma, obtivemos índices (*Baseline Fold Change*), cujos valores acima de 1 indicam aumento, e valores abaixo de 1 indicam redução na produção de um dado fator solúvel após imunização. Os números acima de cada barra representam o número de voluntários que apresentaram os índices do fator solúvel acima de 1 dentre o total de voluntários avaliados.

De uma maneira geral, a imunização leva ao aumento dos níveis de quimiocinas circulantes 7 dias após a imunização, seguido por redução significativa nos níveis desses fatores no soro dos voluntários após 30 dias. Destaca-se a maior produção de quimiocinas com papel

importante na migração de linfócitos durante a resposta a infecções, como CCL5, CCL3 e CXCL10. Em relação a produção de citocinas, o padrão de aumento da produção 7 dias após a imunização já não acontece na maioria dos voluntários avaliados. Mas, como foi visto com os níveis das quimiocinas, ocorre uma redução nos níveis desses fatores solúveis 30 dias após a vacinação. No entanto, no período entre 10 e 15 dias após a imunização é possível ver um aumento expressivo na produção de IL-6, citocina importante para a diferenciação e manutenção de linfócitos Tfh, a qual 90% dos voluntários avaliados apresentam índices acima de 1. Já em relação aos fatores de crescimento, vimos que nenhum deles possui produção aumentada de forma expressiva após a imunização, mas que todos apresentam níveis reduzidos após 30 dias.

Em conjunto, esses dados apontam que a dose fracionada da vacina contra a febre amarela induz a produção de quimiocinas importantes para o recrutamento de linfócitos nos primeiros 7 dias após a imunização, além de induzir a produção de IL-6, citocina envolvida na diferenciação de linfócitos Tfh, entre 10 e 15 dias após a vacinação.

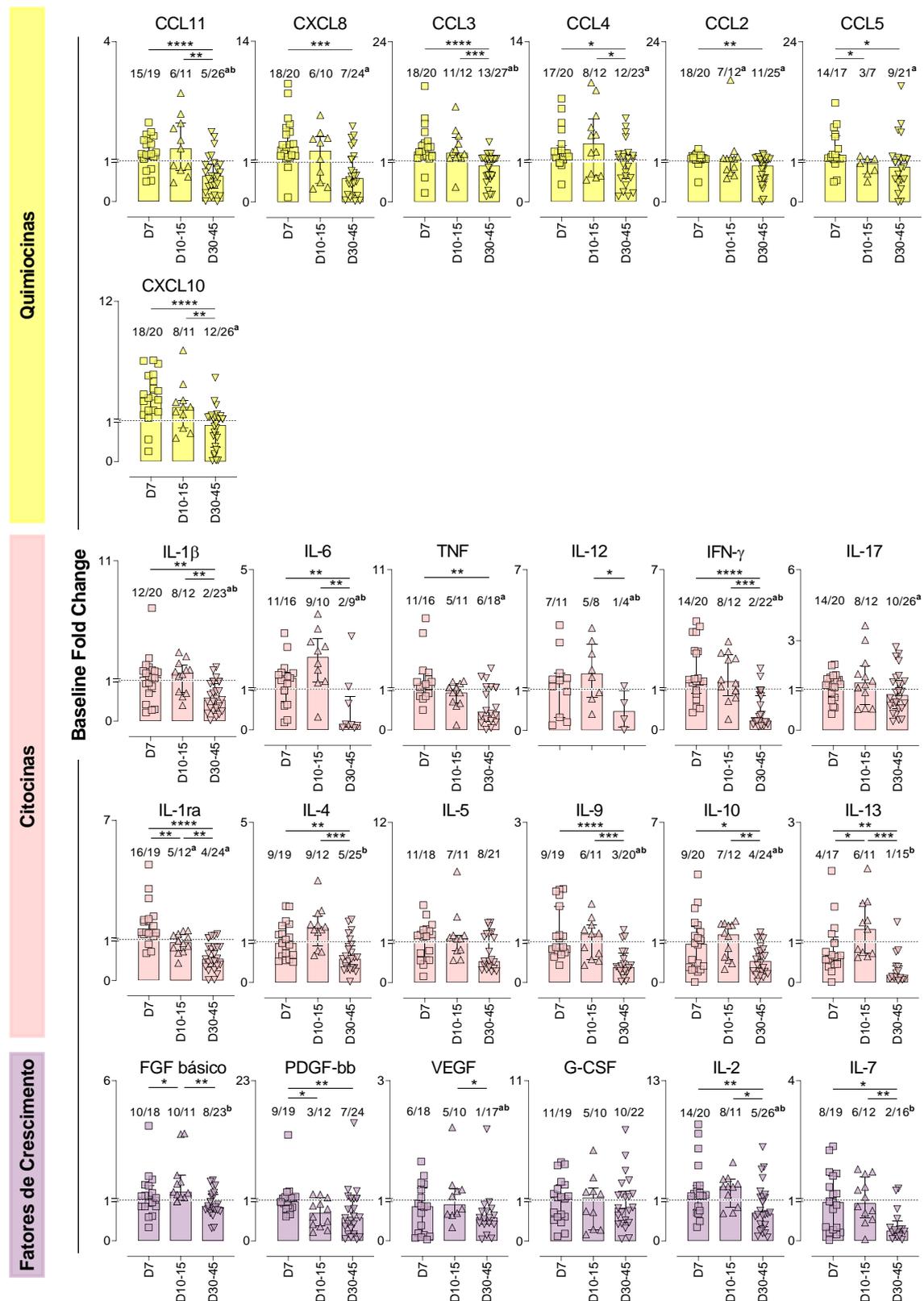


Figura 6 – Perfil da produção de fatores solúveis séricos pós vacinação contra a febre amarela. A quantificação de fatores solúveis foi feita por ensaios de Luminex 27-plex, como descrito em Materiais e Métodos, e os resultados foram expressos em índices, calculados a partir da razão entre os valores obtidos em UI/mL nos dias avaliados dividido pelo valor obtido do mesmo indivíduo antes da vacinação. Os valores acima das barras indicam quantos

indivíduos apresentam índices acima de 1 dentro do n total, e as letras 'a' e 'b' indicam diferença estatística (teste de qui-quadrado) desse valor em relação aos dias 7 e 10-15, respectivamente. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0,0001$.

4.3. LINFÓCITOS T CD8⁺ QUE EXPRESSAM MARCADORES DE ATIVAÇÃO SÃO ENCONTRADOS EM MAIORES QUANTIDADES APÓS A VACINAÇÃO

Para caracterizar as alterações das subpopulações de linfócitos T CD8⁺ induzidas pela imunização com a dose fracionada da vacina contra febre amarela, foram realizados ensaios de imunofenotipagem utilizando PBMC obtido de coágulos de voluntários. Essas células foram marcadas utilizando os anticorpos anti-CD3, anti-CD8, anti-CD45RO, anti-CXCR5, anti-CXCR3, anti-CCR6, anti-ICOS e anti-PD-1. A população de linfócitos foi selecionada, dentro da população de células que passaram individualmente pelo feixe de luz do citômetro de fluxo durante a aquisição (*single cells*), pelas suas características morfométricas, visualizadas no *dot plot* de tamanho (*forward-scatter* (FSC)) por complexidade (*side-scatter* (SSC)). Dentro da população de linfócitos, as células T CD8⁺ foram identificadas pela coexpressão dos marcadores CD3 e CD8, e os demais marcadores utilizados foram analisados dentro dessa população celular.

Não foram vistas diferenças na porcentagem de linfócitos T totais, CD3⁺, nem de linfócitos T CD8⁺ nos tempos avaliados após a imunização. No entanto, ao analisarmos os demais marcadores, observamos perfis diferente entre os dias após a imunização. Observa-se que 7 dias após a imunização com a dose fracionada da vacina há um aumento na porcentagem de células T CD8⁺ que expressam CXCR5⁺ e PD-1⁺, e as células T CD8⁺ que expressam PD-1⁺ permanecem elevadas entre 10 e 15 dias após a vacinação, juntamente com linfócitos T CD8⁺ que expressam CXCR3⁺ e CCR6⁺.

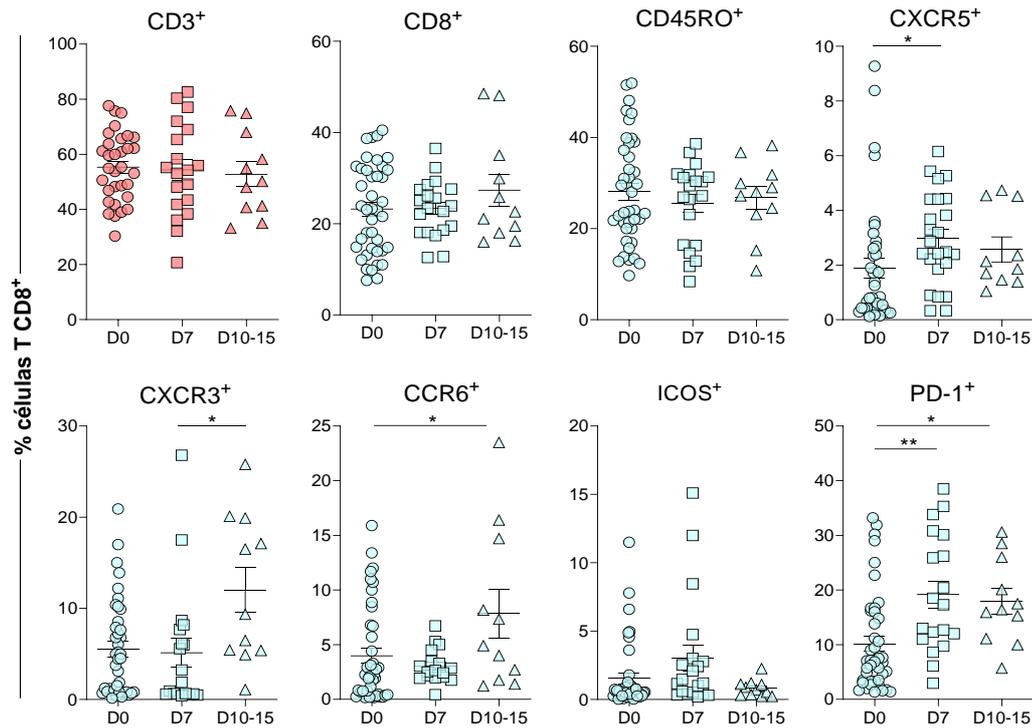


Figura 7 - Análise fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD8⁺ após imunização com a dose fracionada da vacina contra a febre amarela. PBMC de indivíduos imunizados com a dose fracionada da vacina contra a febre amarela foram analisados *ex vivo* por citometria de fluxo quanto à expressão de marcadores de ativação e memória dentro da população de linfócitos T CD3⁺ CD8⁺. Resultados expressos em porcentagem. As linhas representam a média dos valores de cada grupo e as barras de erro representam SEM. **p*<0.05, ***p*<0.01.

4.4. A DOSE FRACIONADA DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA INDUZ MAIOR ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺, UM AUMENTO NA QUANTIDADE DE LINFÓCITOS TFH CIRCULANTES E ELEVA A PROPORÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES TH1 E TH17

Para caracterizar as subpopulações de linfócitos T CD4⁺, foram realizados ensaios de imunofenotipagem utilizando PBMC obtido de coágulos de voluntários imunizados. Essas células foram marcadas utilizando os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD45RO, anti-CXCR5, anti-CXCR3, anti-CCR6, anti-ICOS e anti-PD-1. A população de linfócitos foi selecionada como descrito acima, e as células T CD4⁺ foram identificadas pela coexpressão dos marcadores CD3⁺ e CD4⁺. Os demais marcadores utilizados foram analisados dentro dessa população celular.

Não foram vistas diferenças na porcentagem de linfócitos T CD3⁺ CD4⁺ nos tempos avaliados após a imunização. Porém, é possível observar um aumento na porcentagem de linfócitos T CD4⁺ que expressam os marcadores de ativação ICOS⁺ e PD-1⁺ 7 dias após a

imunização, e as células PD-1⁺ permanecem aumentadas 15 dias após a imunização. Além disso, no dia 7 também observa-se uma maior porcentagem de linfócitos T CD4⁺ que coexpressa os marcadores CD45RO⁺ CXCR5⁺ ICOS⁺ PD-1⁺, e essas células, de acordo com a literatura, são os linfócitos Tfh de memória (SCHMITT; BENTEBIBEL; UENO, 2014).

Dentro das populações de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos Tfh foi feita outra análise de expressão de marcadores, que consiste no padrão de coexpressão de CXCR3 e CCR6, o que nos permite avaliar as subpopulações linfócitos T efetores Th1/Th2/Th17. Nossos resultados demonstram que, dentro de ambas as populações de células T CD4⁺ e de células Tfh, ocorre um aumento na proporção de células Th17 (CXCR3⁻ CCR6⁺) no dia 7 pós vacinação, e um aumento de células Th1 (CXCR3⁺ CCR6⁻) 15 dias após a imunização

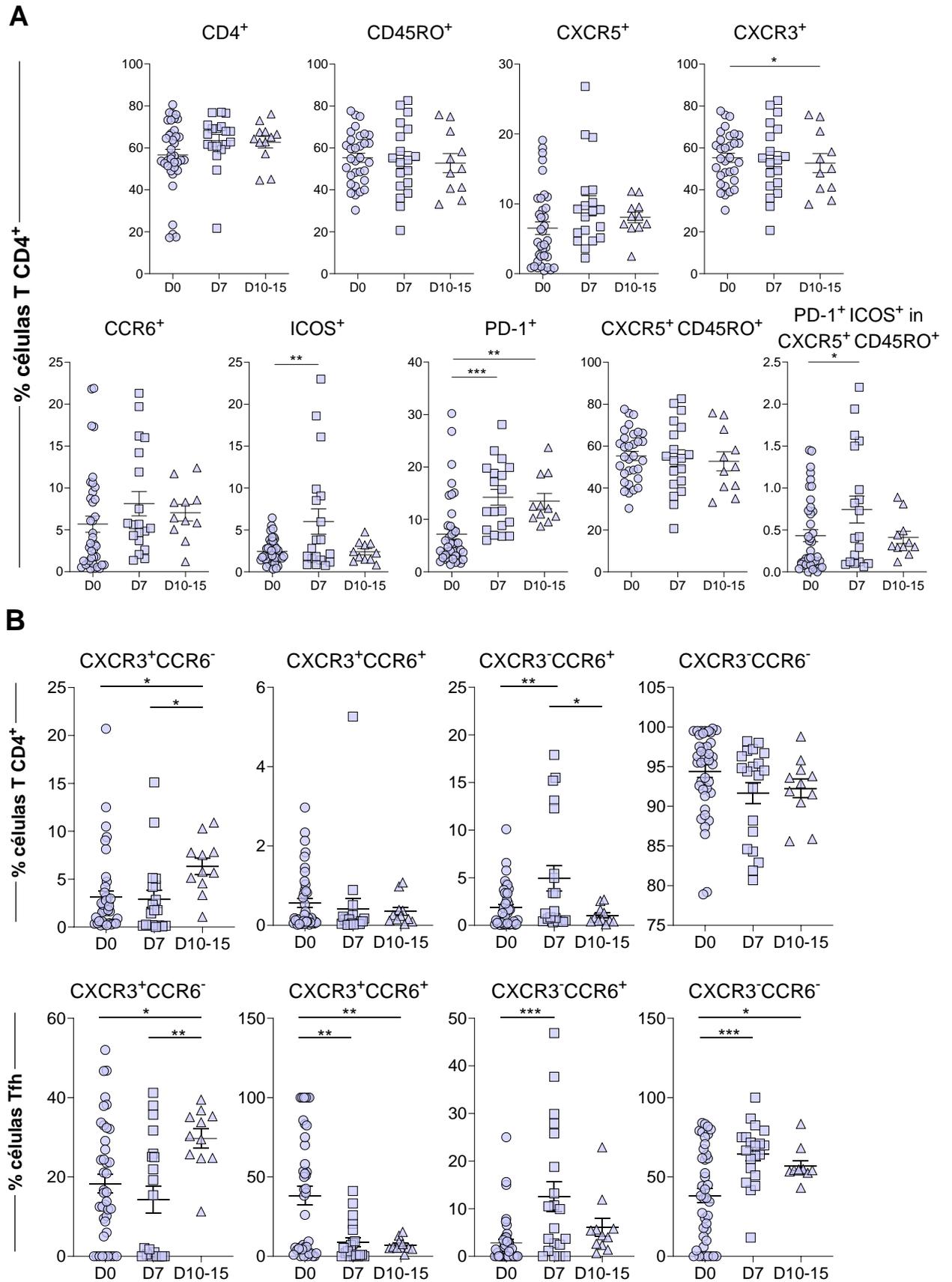


Figura 8 - Análise fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ após imunização com a dose fracionada da vacina contra a febre amarela. PBMC de indivíduos imunizados com a dose fracionada da vacina contra a febre amarela foram analisados *ex vivo* por citometria de fluxo quanto à (A) expressão de marcadores de ativação e

memória dentro da população de linfócitos T CD3⁺ CD4⁺ e à (B) coexpressão de CXCR3 e CCR6, o que define as subpopulações de Th1/Th2/Th17, dentro da população de linfócitos T CD3⁺ CD4⁺ e da população de células Tfh. Resultados expressos em porcentagem. As linhas representam a média dos valores de cada grupo e as barras de erro representam SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

4.5. A POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS B DE MEMÓRIA CLÁSSICA SOFRE EXPANSÃO 15 DIAS APÓS A IMUNIZAÇÃO

Para caracterizar subpopulações de linfócitos B, foram realizados ensaios de imunofenotipagem utilizando PBMC obtido de coágulos de voluntários imunizados com a dose fracionada na vacina contra febre Amarela. Essas células foram marcadas utilizando os anticorpos anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21, anti-CD38, anti-CD27 e anti-IgD. Anticorpos anti-CD3/CD14 foram utilizados para exclusão de células não desejadas nas análises. A população de linfócitos foi selecionada como descrito acima e dentro da população de linfócitos, as células B foram identificadas como CD19⁺ CD3⁻ CD14⁻, e os demais marcadores utilizados foram analisados dentro dessa população celular.

Não foram vistas diferenças na porcentagem de linfócitos B CD19⁺ nos tempos avaliados após a imunização. Avaliando a expressão dos demais marcadores analisados, observamos um aumento na porcentagem de linfócitos B de memória clássica nos dias 10-15 após a imunização com a dose fracionada da vacina contra a febre amarela. Essa população celular foi avaliada de duas maneiras distintas, pela coexpressão de CD19⁺ CD27⁺ CD21⁺, e pela coexpressão de

CD19⁺ CD27⁺, mas ausência da imunoglobulina D (IgD⁻), indicando que essas células passaram pelo processo de mudança de isotipo.

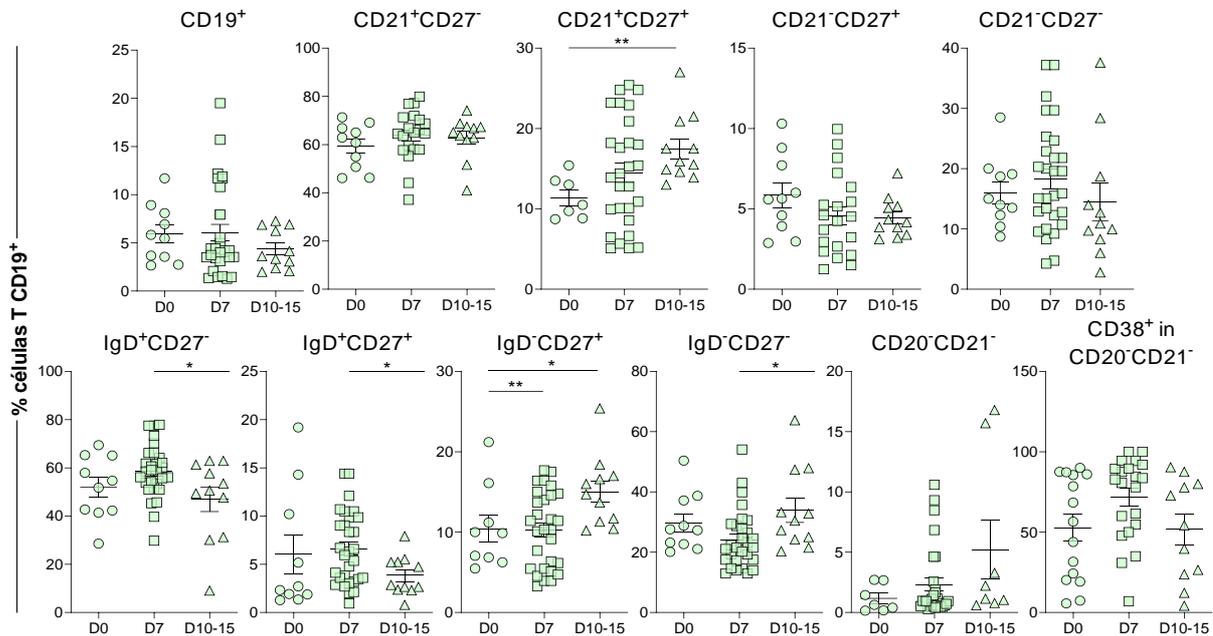


Figura 9 - Análise fenotípica de subpopulações de linfócitos B CD19⁺ após dose fracionada da vacina. PBMC de indivíduos imunizados com a dose fracionada da vacina contra a febre amarela foram analisados ex vivo quanto à expressão de marcadores de ativação e memória dentro da população de linfócitos T CD19⁺ (CD3⁻ CD14⁻). Resultados expressos em porcentagem. As linhas representam a média dos valores de cada grupo e as barras de erro representam SEM. *p<0.05, **p<0.01.

4.6. HÁ ALTA CORRELAÇÃO DE LINFÓCITOS B COM OS FATORES SOLÚVEIS DOSADOS 30 DIAS APÓS IMUNIZAÇÃO COM A DOSE FRACIONADA DA VACINA CONTRA A FEBRE AMARELA

Com o objetivo de determinar se existe associação entre a produção dos fatores solúveis dosados e as subpopulações de linfócitos avaliadas, uma matriz de correlação foi construída utilizando-se o cálculo do coeficiente de correlação (r). A partir dessa análise, foi realizada uma rede de conectividades utilizando o software Cytoscape (v3.8.2) para ilustrar a matriz de correlação.

Na figura, a rede de conectividades à esquerda apresenta círculos, e cada círculo corresponde a uma subpopulação celular ou fator solúvel. Em sentido horário, os círculos em roxo representam fatores de crescimento, em rosa claro temos as citocinas e em amarelo as quimiocinas. Os linfócito B CD19⁺ estão representados em verde, os linfócitos T CD8⁺ são os

círculos azuis, os linfócitos T CD4⁺ estão representados pelos círculos roxo claro e a população total de linfócitos T CD3⁺ é representada pelo círculo vermelho.

A matriz de mapa de cores foi traçada e representada no centro, mostrando qual a força das conectividades entre os fatores solúveis e as subpopulações celulares. As correlações foram representadas por uma escala de cores, onde o verde representa conexões negativas ($r < 0$) e o vermelho representa as correlações positivas ($r > 0$). À direita da figura, a tabela representa quais as subpopulações celulares e quais fatores solúveis fazem a maior quantidade de conexões em cada dia analisado.

O resultado obtido mostra que no dia 0, antes da vacinação, a subpopulação que mais faz conectividades com os fatores solúveis são os linfócitos T CD4⁺, principalmente a subpopulação que expressa o marcador PD-1⁺ (Figura 10), e todas essas conectividades são positivas, com os valores de $r \geq 0,1$, e algumas poucas conectividades são provenientes de linfócitos T CD8⁺. Já no dia 7 após a imunização, o perfil de conectividades se altera significativamente, com uma maior distribuição das conectividades, que ocorre devido a um aumento nas subpopulações de linfócitos T e B que fazem correlações com fatores solúveis (Figura 10). Além disso, o padrão dessas conectividades se altera, sendo a grande maioria delas negativa, com $r \leq -0,1$.

Finalmente, no dia 10 após a vacinação, as conectividades entre as populações celulares e os fatores solúveis assume um perfil ainda mais alterado quando comparado às conectividades basais observadas no dia 0. É possível ver uma maior concentração de conectividades partindo de linfócitos B. As células B de memória clássica e os plasmócitos ativados estão entre as subpopulações celulares que mais fazem correlações com fatores solúveis. Essas conectividades possuem perfil misto, com alta concentração de correlações positivas e negativas (Figura 10).

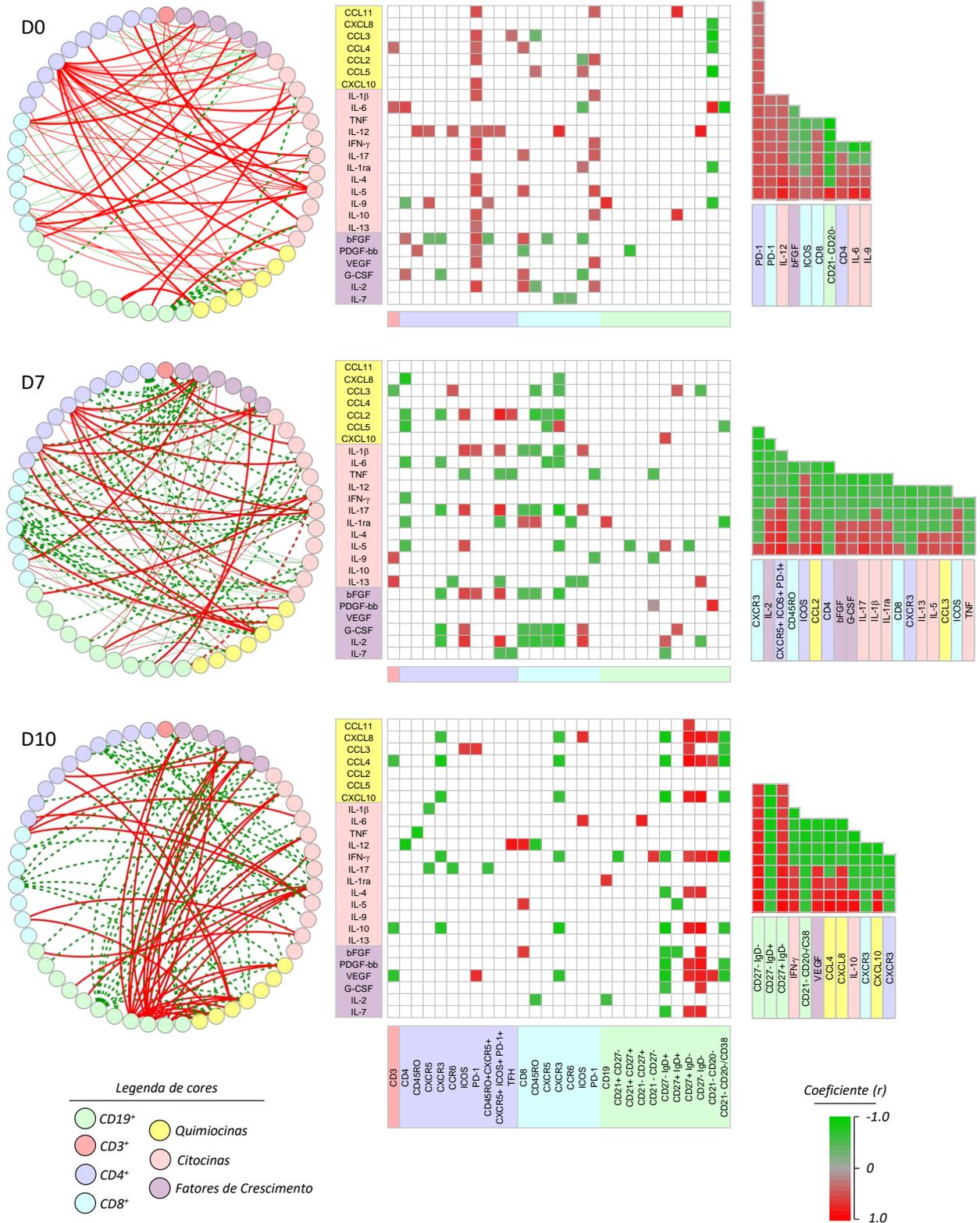


Figura 10 - Perfil de conectividade entre linfócitos e fatores solúveis avaliados. Os testes de Spearman e Pearson foram aplicados para avaliar as correlações múltiplas entre as populações celulares e os fatores solúveis. A rede de conectividades (esquerda) ilustra as correlações vistas na matriz, no qual as linhas mais grossas indicam $-0.5 < r > 0.5$, e as linhas mais finas $-0.5 > r > 0.5$. A matriz de mapa de cores foi traçada (meio) mostrando a força dessas correlações (-1 verde, para +1 vermelho), e a tabela (direita) mostra quais subpopulações ou fatores solúveis fazem mais conectividades no período analisado.

5. DISCUSSÃO

Com o ressurgimento de novos surtos de febre amarela em regiões endêmicas e a ocorrência de surtos esporádicos em regiões previamente consideradas não endêmicas, a necessidade de se elevar a cobertura vacinal contra a doença é cada vez maior. Como não há um modelo animal que reproduza com precisão a cinética da patologia em humanos (JULANDER, 2016) e a replicação do vírus *in vitro* somente ocorre de forma eficaz em tecido de embrião de galinha, a tecnologia utilizada para produzir a vacina não evoluiu muito desde o seu desenvolvimento.

Em 1975, um comitê de especialistas em padronizações biológicas se reuniu em Genebra para revisar os requerimentos necessários para a produção dos imunizantes contra a febre amarela, e foi definido que o número de partículas virais que compõem a vacina deve ser de no mínimo 1.000 MLD₅₀ (dose letal média para 50% de camundongos após administração intracerebral) ou o seu correspondente em Unidades Formadoras de Placa (PFU), cerca de 5.000 PFU/mL, sem dose máxima definida. A razão MLD₅₀/PFU varia de vacina para vacina em virtude de diferenças entre os testes utilizados por cada fabricante, por isso a dose recomendada para uso em humanos deve ser informada em Unidades Internacionais (UI/mL) (“WHO Expert Committee On Biological Standardization Annex I - Requirements for Yellow Fever Vaccine”, 1976), e o valor ideal seria aproximadamente 3.000 UI/mL.

Visando otimizar o uso das vacinas já produzidas e distribuídas, a partir do final dos anos 80 alguns estudos testaram inóculos do imunizante em menor concentração, dentro dos limites estabelecidos pela OMS, quanto a sua capacidade de gerar uma resposta imune eficaz e duradoura com o intuito de sanar a demanda aumentada e urgente por mais vacinas. Levando esses estudos em consideração, mas frisando que são necessários mais dados relacionados a efeitos adversos atribuídos à dose fracionada e informações sobre a imunogenicidade da dose fracionada em crianças e idosos, a OMS autorizou o uso da concentração de um quinto da dose plena (equivalente a 0,1 mL) administrada via subcutânea ou intramuscular. Essa diluição foi selecionada por estar dentro das concentrações consideradas ideais para uso pelos estudos analisados, e por 0,1 mL ser o volume mínimo que pode ser administrado por seringas graduadas. Com isso, campanhas de vacinação utilizando a dose fracionada em um quinto se iniciaram em julho de 2016.

O primeiro estudo utilizando doses reduzidas da vacina contra a febre amarela foi realizado por Lopes et al. em 1988, no qual os autores compararam a resposta sorológica em 259 homens no Rio de Janeiro, com idades entre 18 e 47 anos, utilizando doses variadas da vacina 17DD contra a febre amarela com o objetivo de determinar a dose mínima necessária para gerar 100%

de soroconversão. Foram testadas doses contendo uma média de 2.000 PFU/mL e 5950 LD₅₀. Essas doses foram diluídas em 1:10 (200 PFU/mL; 595 LD₅₀), 1:60 (33 PFU/mL; 99LD₅₀), 1:100 (20 PFU/mL; 59,5LD₅₀) e 1:1000 (2 PFU/mL; 5,5LD₅₀). Os resultados mostram que doses diluídas em 1:10 são capazes de induzir soroconversão de 100% dos imunizados, mas que diluições maiores do que 1:60 induzem soroconversão abaixo de 90% (DE SOUZA LOPES; DE ALMEIDA GUIMARÃES; DE CARVALHO, 1988). No entanto, os métodos recomendados para o teste de potência da vacina, principalmente a técnica de cultura celular para o cálculo de PFU, foram se aprimorando com o passar dos anos, e com isso os resultados desse estudo se tornaram obsoletos.

Roukens et al. avaliou em 2008, na Holanda, a eficácia e a segurança da dose fracionada aplicada por outra via de administração. Nesses experimentos, os autores administraram um quinto da dose da vacina 17D-204 intradermicamente e a dose regular foi administrada via subcutânea. Os 155 indivíduos foram avaliados em um estudo randomizado, no qual 77 voluntários foram imunizados com a dose fracionada intradérmica e 78 com a dose plena subcutânea. Os resultados mostram que 2, 4 e 8 semanas, e 1 ano após a imunização, os títulos de anticorpos neutralizantes dos indivíduos vacinados com a dose fracionada intradérmica e dos vacinados com a dose plena subcutânea foram praticamente idênticos. Além disso, a cinética da resposta humoral foi parecida entre os dois grupos, com pico de produção de anticorpos neutralizantes ocorrendo após 4 semanas da imunização. A dose regular utilizada apresentava aproximadamente 35.000 PFU/0,5 mL, aproximadamente 5.000 LD₅₀, e um quinto da dose regular (7.000 PFU/0,1 mL; 1.000 LD₅₀) ainda estava dentro dos padrões considerados ideais pela OMS para administração em humanos (ROUKENS et al., 2008). No entanto, esse estudo foi realizado com um número muito pequeno de voluntários, além de ter sido realizado com indivíduos que não residem em áreas endêmicas para a febre amarela, dessa forma seus achados podem não se estender de forma integral para indivíduos que residem em locais de risco.

Campi-Azevedo et al. realizou um estudo no Brasil em 2014 no qual os autores compararam a cinética da viremia entre 590 indivíduos vacinados com a dose regular da vacina 17DD (27.476 UI/mL; 52.480 PFU/mL) e outras 5 diluições: 10.447 UI/mL (19.953 PFU/mL), 3.013 UI/mL (5.754 PFU/mL), 587 UI/mL (1.122 PFU/mL), 158 UI/mL (302 PFU/mL) e 31 UI/mL (59 PFU/mL). Foi visto que indivíduos imunizados com diluições de até 587 UI/mL apresentaram uma média de soroconversão de 97%. No entanto, viremia foi apenas observada nas duas primeiras diluições utilizadas para imunização (10.447 UI/mL e 3.013 UI/mL), que induziram uma cinética similar à dose plena com pico de carga viral 5 dias após a imunização

e com redução da carga viral detectável após 7 dias, e as demais diluições induziram picos tardios de viremia (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014). Nossos resultados mostraram que uma quantidade pequena de pacientes imunizados com a dose fracionada apresentou carga viral detectável 7 dias após a vacinação, que foi o primeiro ponto no qual avaliamos viremia. Já entre 10 e 15 dias após a imunização quase todos os pacientes avaliados não apresentavam mais carga viral detectável, o que corrobora com o que foi descrito por Campi-Azevedo et al..

Um estudo realizado no Brasil em 2013 por Martins et al. avaliou a imunogenicidade e a reatogenicidade de 6 diferentes diluições da vacina 17DD produzida por Biomanguinhos. Foram recrutados 749 indivíduos, com idade média de 19,4 anos, que foram divididos em grupos imunizados com a dose plena (27.476 UI/mL; 52.480 PFU/mL) ou com outras 5 diluições do imunizante: 10.447 UI/mL (19.953 PFU/mL), 3.013 UI/mL (5.754 PFU/mL), 587 UI/mL (1.122 PFU/mL), 158 UI/mL (302 PFU/mL) e 31 UI/mL (59 PFU/mL). Os resultados indicam que a soroconversão se mantém alta (média de 98%) com a administração da diluição de até 587 UI/mL, e as diluições de 158UI/mL e 31 UI/mL não induzem uma soroconversão adequada. A duração da imunidade foi avaliada 10 meses após a vacinação e mostrou níveis satisfatórios de anticorpos neutralizantes em quase todos os voluntários após esse tempo. Uma exceção foi encontrada no grupo vacinado com 31 UI/mL que apresentaram níveis reduzidos de anticorpos neutralizantes após 10 meses quando comparados aos indivíduos imunizados com as outras diluições, mas ainda assim 89% dos voluntários desse grupo possuíam anticorpos após esse tempo. Uma viremia muito baixa foi detectada nesses voluntários até 36 dias após a vacina, com pico de cópias virais detectadas 5 dias após a imunização (9% de indivíduos com detecção de cópias virais no sangue) (MARTINS et al., 2013). Nossos achados mostram que 100% dos pacientes avaliados apresentaram soroconversão 30-45 dias após imunização com a dose fracionada estabelecida pela OMS, produzindo altos títulos de anticorpos neutralizantes específicos contra o vírus da febre amarela. Vale ressaltar que a produção de altos níveis de anticorpos neutralizantes e específicos é essencial para uma resposta rápida e robusta em casos de infecção pelo vírus da febre amarela, e, portanto, garante a eficácia da dose fracionada da vacina em induzir uma resposta humoral efetiva.

Recentemente, um estudo conduzido em 2016 por Casey et al. no Congo selecionou indivíduos em grupos de acordo com suas idades: entre 2 e 5 anos, entre 6 e 12 anos, entre 13 e 49 anos e 50 anos ou mais. Crianças com menos de 2 anos e mulheres grávidas não foram elegíveis para o estudo pois os procedimentos da campanha de vacinação no país indicavam o uso da dose plena nesses indivíduos. Todos os pacientes selecionados foram imunizados com a dose fracionada da vacina contra a febre amarela e foram avaliados 1 mês (716 indivíduos) e 1

ano (684 dos indivíduos analisados na primeira fase) após a imunização. Os resultados mostram que 98% dos voluntários apresentavam anticorpos neutralizantes contra o vírus da febre amarela, e que 97% dos 684 indivíduos que compareceram após 1 ano ainda eram soropositivos. Analisando a média geométrica de títulos de anticorpos, indivíduos com 50 anos ou mais apresentaram resultados menores no 1º mês quando comparados a indivíduos entre 13 e 49 anos, mas após 1 ano da imunização a média geométrica de títulos desses pacientes acima de 50 anos foi similar ao grupo entre 13 e 49 anos. Foi observado que crianças com menos de 13 anos apresentaram uma baixa média geométrica de título de anticorpos, mesmo após 1 ano da vacinação, quando comparados aos outros grupos avaliados. Eventos adversos relacionados ao uso da dose fracionada não foram identificados (CASEY et al., 2018).

Os pacientes selecionados para o nosso estudo apresentaram uma média de idade de 44 anos (entre 19 e 65 anos), entre eles 42 mulheres e 30 homens. A titulação de anticorpos neutralizantes dos pacientes 30 dias após a imunização apresentou resultados muito similares entre todos os indivíduos analisados, independentemente da idade e do sexo. A coleta de amostras de crianças foi muito escassa, e dessa forma elas não foram acrescentadas ao estudo. Análises mais aprofundadas sobre a indução de resposta humoral induzida pela dose fracionada em crianças, e as diferenças dessa resposta em indivíduos de regiões e condições socioeconômicas diferentes devem ser feitas.

A titulação de anticorpos IgG específicos induzidos após a imunização contra a febre amarela é comumente feita por ensaios de ELISA que utilizam antígenos específicos do envelope viral para detectar anticorpos em amostras sorológicas. No entanto, pode ocorrer reatividade cruzada entre vários flavivírus, incluindo dengue (SCHWARTZ et al., 2000), e a febre amarela e a dengue possuem alto potencial de ocorrência simultânea em regiões da África e América do Sul (ROGERS et al., 2006). Para contornar essa interferência, nós calculamos a razão entre o título de um indivíduo nos dias 7-10 ou 30-45 após a imunização e o resultado desse mesmo indivíduo no dia 0, antes da vacinação. Nossos resultados demonstram que, nos dias 30 a 45 após a imunização, aproximadamente 95% dos pacientes haviam soroconvertido.

Altas taxas de anticorpos neutralizantes cuja produção foi induzida pela dose fracionada da vacina contra febre amarela foram detectadas em estudos alguns anos após a administração da vacina. Em 2018, Roukens et al. avaliou a duração da imunidade induzida pela dose fracionada (0,1 mL), administrada pela via intradérmica no estudo previamente citado de 2008, em 75 indivíduos. Desses 75 pacientes, 40 haviam recebido a dose fracionada via intradérmica, e 98% deles ainda possuíam altos níveis de anticorpos neutralizantes contra o vírus da febre amarela (ROUKENS et al., 2018). Martins et al. também avaliou em 2018 os títulos de anticorpos

neutralizantes após 8 anos da administração da dose plena de 17DD (27.476 UI/mL; 52.480 PFU/mL) e outras 5 concentrações: 10.447 UI/mL (19.953 PFU/mL), 3.013 UI/mL (5.754 PFU/mL), 587 UI/mL (1.122 PFU/mL), 158 UI/mL (302 PFU/mL) e 31 UI/mL (59 PFU/mL) em um estudo de dose-resposta realizado em 2009 por Biomanguinhos no Brasil. No total, 318 pacientes foram elegíveis para o estudo, e cerca de 85% dos indivíduos que haviam soroconvertido 1 mês após a imunização com as concentrações de 10.447 UI/mL, 3.013 UI/mL e 587 UI/mL apresentaram níveis de anticorpos neutralizantes similares aos níveis observados em pacientes imunizados com a dose plena (27.476 UI/mL) após 8 anos (DE MENEZES MARTINS et al., 2018).

As citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento são fatores solúveis que possuem papéis variados e importantes nas respostas imune do indivíduo. As citocinas são proteínas capazes de estimular células tanto da resposta imune inata quanto a adaptativa, e elas são produzidas em resposta a estímulos inflamatórios ou antigênicos. As citocinas podem regular a magnitude e a natureza das respostas imunes ao induzir a diferenciação e proliferação de diferentes tipos celulares, incluindo linfócitos T e B. No entanto, a sua produção em excesso pode causar danos teciduais ou efeitos sistêmicos graves (OBERHOLZER; OBERHOLZER; MOLDAWER, 2000). Já as quimiocinas atuam de maneira distinta no recrutamento de células do sistema imune que possuem diferentes perfis de ativação, e conseqüentemente diferentes padrões de expressão de receptores de quimiocinas. No entanto, a capacidade de controlar o tráfego de quase todas as células no corpo sugere que as funções das quimiocinas vão além do recrutamento celular (ESCHE; STELLATO; BECK, 2005). Assim, sua atuação abrange a coordenação das interações entre a resposta imune inata e adaptativa (SOKOL; LUSTER, 2015). Já os fatores de crescimento, que podem ser produzidos por células sanguíneas, células teciduais e glândulas, atuam na proliferação de células e ocasionalmente na diferenciação celular, o que confere a eles um papel na modulação do sistema imune (THOMAS; LOPEZ, 2015).

Meulen et al. buscou compreender a contribuição de citocinas no agravamento da febre amarela, e para isso dosou citocinas em pacientes infectados em uma epidemia que ocorreu em Guiné entre agosto de 2000 e janeiro de 2001. Ao analisar amostras séricas de 18 pacientes com febre amarela não fatal e não hemorrágica, 11 pacientes com febre amarela não fatal e hemorrágica e 7 pacientes que foram a óbito com a doença, os autores encontram níveis mais altos de IL-6, CCL2, CXCL10, TNF e IL-1ra em pacientes que foram a óbito. Pacientes com febre amarela hemorrágica apresentaram apenas CXCL10 e IL-1ra elevados e níveis baixos de IL-8 (TER MEULEN et al., 2004). Em 1998, Hacker et al. cria a hipótese de que a produção de

altos níveis de TNF após a vacinação contra a febre amarela era responsável pelos sintomas de mal-estar, mialgia e febre baixa, comuns após a imunização. Plasma de 15 pacientes saudáveis pré-vacinados e até 2 dias após a vacina, e de 11 indivíduos após 11 dias de imunização mostraram que o pico de produção de TNF acontecia nos dias 2 e 7 após a vacinação, e era acompanhado do aumento de citocinas induzidas por TNF, como IL-1ra e IL-6 (HACKER et al., 1998). Outros estudos demonstram que outras citocinas pró-inflamatórias produzidas por Th1 além de TNF, como IFN- γ e IL-2, são detectadas em altos níveis 2 dias após a vacinação (KOHLER et al., 2012), e que um perfil misto de citocinas pró e anti-inflamatórias ocorre paralelamente, com aumento da secreção de IL-10 e expressão de IL-10R por células do sistema imune inato. Essa ativação e modulação simultânea do sistema imune pode ser responsável pela resposta imune gerada pela vacinação contra a febre amarela (MARTINS et al., 2008). Uma resposta conjunta de citocinas Th2 também já foi demonstrada em caso de reestímulo *in vitro*, com elevação de IL-5 e IL-13 após estímulo de células dendríticas de pacientes já vacinados com vírus 17D vivo ou atenuado (GAUCHER et al., 2008)

Pouco se sabe sobre a cinética da produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento induzida pela dose fracionada da vacina contra a febre amarela. Ao analisar a produção de fatores solúveis após imunização com a dose regular da vacina 17DD (27.476 UI/mL; 52.480 PFU/mL) e outras 5 diluições: 10.447 UI/mL (19.953 PFU/mL), 3.013 UI/mL (5.754 PFU/mL), 587 UI/mL (1.122 PFU/mL), 158 UI/mL (302 PFU/mL) e 31 UI/mL (59 PFU/mL), Campi-Azevedo et al. destacou que apenas concentrações de até 3.013 UI/mL são capazes de desencadear cinéticas semelhantes de produção de citocinas pró-inflamatórias TNF, IFN- γ e IL-2, e das citocinas moduladoras IL-5, produzida principalmente por resposta Th2, possivelmente em resposta a proteínas do ovo encontradas na vacina, e IL-10, ambas com a função de inibir a resposta Th1, similares à dose plena normalmente utilizada (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014)

Nossos resultados destacam a maior produção de quimiocinas com papel importante na migração de linfócitos durante resposta a infecções, como CCL5 e CCL3, que estão correlacionados com respostas do tipo Th1 (TRUMPFHELLER et al., 1998), e CXCL10, responsável por atrair linfócitos que expressam o marcador de superfície CXCR3, um receptor cuja expressão está relacionada a produção de IFN- γ (GROOM; LUSTER, 2011). Observamos que a citocina IL-2 se encontra aumentada entre os dias 7 e 15 após a imunização, produzida após ativação do Receptor de Células T (TCR), e ela possui um papel na inativação das células Tfh por reprimir a expressão de Bcl-6 por essas células, e essa proteína é essencial para a diferenciação e manutenção dessas células. Também se mostra elevada a produção da citocinas

IL-6 entre 7 e 15 dias após a vacinação, e sabe-se que a IL-6 tem um importante papel na atuação de linfócitos T CD4⁺ foliculares auxiliares (Tfh) no centro germinal (CHAVELE; MERRY; EHRENSTEIN, 2015), pois a IL-6 impede que as células Tfh expressem IL-2R. (PAPILLION et al., 2019). Quanto aos fatores de crescimento, não foi vista produção aumentada de nenhum dos fatores dosados, mas, como ocorre com as quimiocinas e citocinas, é possível visualizar uma queda em seus níveis 30 dias após a aplicação da dose fracionada da vacina.

Silva et al. descreveu que nos dias 15 e 30 após a imunização com a dose plena da vacina contra a febre amarela, altas porcentagens de monócitos IL-10⁺ são detectados no sangue de pacientes imunizados (SILVA et al., 2011), o que corrobora com os dados de Martins et al. que mostram um aumento da expressão de IL-10R em monócitos 15 dias após a imunização com 17DD (MARTINS et al., 2008). Já foi descrito que a IL-10 atua como regulador das respostas inflamatórias de Th1 e Th2, inibindo a produção das citocinas IL-2, IFN- γ , TNF, IL-4 e IL-5 (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). A IL-10 pode ser produzida também por células T, incluindo as Treg e Th1, quando estimuladas por exemplo por IL-27 e IL-12 (KUBO; MOTOMURA, 2012; SARAIVA et al., 2009) e, de maneira intrigante, quando estimuladas por IL-4 (MITCHELL et al., 2017). Como já foi demonstrado por Campi-Azedo et al., 30 dias após a imunização com a dose fracionada da vacina ocorre o pico da produção de IL-4 em todas as diluições testadas (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014), e Gaucher et al. demonstrou que as células Th1 induzidas por 17DD permanecem detectáveis no sangue até 1 ano após vacinação (GAUCHER et al., 2008). Esses achados sugerem que a IL-10 pode permanecer elevada 30 dias após a imunização, sendo secretada por monócitos e células Th1, e essa citocina tem papel na redução da expressão de MHC de classe II (DE WAAL MALEFYT et al., 1991a) e inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF, GM-CSF e G-CSF a nível transcricional (DE WAAL MALEFYT et al., 1991b). A citocina IL-13 também atua na redução da secreção de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, CCL3, GM-CSF, G-CSF e TNF por monócitos, e eleva a secreção de IL-1ra por essas células, e ações similares já foram encontradas em relação a citocina IL-4 (DE WAAL MALEFYT et al., 1993). Em conjunto, os níveis elevados de IL-10, IL-13 e IL-4 podem ser responsáveis pela redução brusca na produção de fatores solúveis vista 30 dias após a imunização com a dose fracionada da vacina.

Utilizando os pacientes vacinados em um estudo de dose-resposta realizado em 2009 por Biomanguinhos no Brasil, Costa-Rocha et al. analisou populações de células de memória e foi

observado altos níveis de linfócitos T CD4⁺ de memória central e T CD8⁺ de memória efetora, além de correlação positiva entre memória efetora de CD4⁺ e CD8⁺ em indivíduos vacinados com as doses de 27.476 UI/mL, 10.447 UI/mL, 3.013 UI/mL e 587 UI/ML (DA COSTA-ROCHA et al., 2019). Sabe-se que a resposta imune mediada por células T tem um papel importante na consolidação de uma resposta humoral robusta e portanto contribuem para a alta eficácia da vacina contra a febre amarela (DE MELO et al., 2013), mas pouco foi estudado em relação à resposta celular induzida pela imunização com a dose fracionada da vacina. Por isso, esse estudo teve o objetivo de melhor compreender a cinética da resposta imune mediada por células T em resposta à imunização com a dose fracionada da vacina contra a febre amarela, e como essas células se correlacionam à produção de anticorpos contra o vírus.

Avaliando a resposta celular induzida pela vacina contra a febre amarela, observamos um aumento na porcentagem de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ que expressam marcadores de ativação nos dias 7 e entre os dias 10 e 15 após a vacinação. O aumento na proporção de linfócitos T CD8⁺ que expressa CXCR5⁺ é condizente com a função dessa subpopulação celular em respostas antivirais (YU; YE, 2018). Além de ser transientemente expresso por linfócitos ativado e representar um marcador de ativação, esse receptor de quimiocinas endereça as células que o expressa para os órgãos linfoides secundários. Existem evidências de que as células T CD8⁺ CXCR5⁺ também são encontradas nos centros germinais de linfócitos B, mas ainda não está claro qual o papel dessas células nesses locais (VALENTINE; HOYER, 2019). Os linfócitos T CD8⁺ CXCR3⁺ também estão aumentados 7 dias após a imunização, e são células responsáveis pela secreção de IFN- γ , uma citocina com importante papel na resposta antiviral, e também podem se diferenciar em linfócitos T citotóxicos (GROOM; LUSTER, 2011). Estudos mais recentes mostram que os linfócitos T CD8⁺ CCR6⁺ são essenciais para a manutenção de populações de células de memória no fígado (TSE et al., 2014), e foi demonstrado que a expressão de PD-1 por células T CD8⁺ atua como um inibidor de células efetoras, uma vez que o bloqueio de PD-1 em estágios iniciais de infecção viral de camundongos por vírus da coriomeningite linfocítica manteve as células efetoras funcionais por mais tempo (AHN et al., 2018).

Destaca-se a grande quantidade de células CD4⁺ expressando CXCR3, como mencionado acima, um receptor de quimiocinas cuja expressão está relacionada a produção de IFN- γ , e essas células se diferenciam em linfócitos Th1 (GROOM; LUSTER, 2011), células que possuem papel indispensável na resposta antiviral (MALOY et al., 2000). As células Th1 também auxiliam as células T CD8⁺ CTL na sua atuação contra infecção viral (WHITMIRE, 2011). Como esperado em resposta antivirais, encontramos maior porcentagem de linfócitos T CD4⁺

Th1, definidos pelo fenótipo CXCR3⁺ CCR6⁻. Observamos também aumento na proporção de linfócitos Th17, definidos pela expressão de CD4⁺ CXCR3⁻ CCR6⁺, mas muito ainda se discute sobre o papel ambíguo dessa subpopulação em respostas a infecções virais, pois apesar de possuir algumas características que indicam auxiliar com a proteção contra a infecção, ela também pode contribuir na patogênese viral (MA et al., 2019). Da mesma forma, também foi observado um aumento na proporção de células Tfh com os perfis Th1 e Th17. Como foi descrito anteriormente por Morita et al., as células Tfh Th1 não são capazes de induzir linfócitos B *naïve* a produzir anticorpos, mas a subpopulação Th17 induz a produção de IgG e IgA, sendo assim essas duas subpopulações modulam a resposta humoral de formas distintas (MORITA et al., 2011). No entanto, as células Tfh Th1 são as principais responsáveis por induzir linfócitos B de memória em plasmócitos ativados que secretam anticorpos IgG específicos (BENTEBIBEL et al., 2013).

As Tfh são células T CD4⁺ definidos pela coexpressão dos marcadores de ativação CXCR5⁺ ICOS⁺ PD-1⁺ (BRENNAN et al., 2020; HEIT et al., 2017), podendo expressar o marcador de memória CD45RO⁺ (SCHMITT; BENTEBIBEL; UENO, 2014). Nossos dados mostram que a frequência das células Tfh encontra-se aumentada no dia 7 após a vacinação. As células Tfh são especializadas em auxiliar os linfócitos B, sendo essenciais para a formação do centro germinativo, maturação de afinidade e desenvolvimento da maioria dos anticorpos de alta afinidade e diferenciação de células B de memória (CROTTY, 2014; GOOD-JACOBSON et al., 2010). Muito já se foi discutido sobre a ativação de células Tfh após vacinações e sua correlação com a geração de uma resposta imune duradoura. Em 2001, Schaerli et al. analisou a proliferação de células Tfh após segunda dose da vacina antitetânica. Os autores verificaram um aumento na proporção de linfócitos Tfh de memória (Tfh CD45RO⁺) circulantes 6 dias após a vacinação, demonstrando uma resposta rápida dessas células em caso de reestímulo (SCHAERLI; LOETSCHER; MOSER, 2001). Já Bentebibel descreveu em 2013 que a vacinação contra o vírus influenza leva ao aumento da proliferação de linfócitos Tfh após 7 dias, e que esse aumento está diretamente relacionado com o aumento da secreção de anticorpos, além de demonstrar a capacidade dessas células de induzir a diferenciação de células B de memória em plasmócitos produtores de anticorpos *in vitro* (BENTEBIBEL et al., 2013). Dessa forma, o aumento dessa população induzido pela vacinação fala a favor do uso a dose fracionada da vacina contra a febre amarela.

Ao analisarmos as alterações nas subpopulações de linfócitos B induzidas pela dose fracionada da vacina, vimos um aumento na proporção de células B de memória clássica, CD19⁺ CD27⁺ CD21⁺, e de células B de memória clássica que passaram pelo processo de troca

de isotipo, CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻. Essas duas subpopulações são essenciais para a composição do repertório de células de memória (SHAH et al., 2019), que estarão prontas para atuar rapidamente em caso de infecção pelo vírus da febre amarela. Além disso, o aumento dessas células entre 10 e 15 dias após a imunização condiz com o aumento na porcentagem de células Tfh circulantes 7 dias após a imunização, uma vez que essas células estão diretamente ligadas à proliferação de células B de memória, e se pode relacionar também com a produção de anticorpos neutralizantes e IgG específicos contra o vírus da febre amarela, que se dá início no mesmo período entre 10 e 15 dias após a vacina.

Os linfócitos B de memória clássica específicos para antígenos possuem receptor de células B (BCR) de alta afinidade, e em casos de um segundo contato com o antígeno, essas células rapidamente se diferenciam em células plasmáticas produtoras de anticorpos específicos e de alta afinidade (KALIA et al., 2006). Além do mais, essas células podem persistir por anos sem a necessidade da presença no antígeno, sendo sua manutenção orquestrada em conjunto com linfócitos T de memória e plasmócitos de longa duração (MARUYAMA; LAM; RAJEWSKY, 2000). Um estudo longitudinal realizado em 2 indivíduos vacinados com a dose plena da vacina contra febre amarela 17D-204 mostrou que mesmo após 6 - 9 meses, ainda havia aumento na quantidade de hipermutações somáticas, que levava ao aumento da afinidade de anticorpos e aumento da sua capacidade de neutralização viral, e isso indica que o centro germinal continua ativo meses após a imunização (WEC et al., 2020). Já as células B de memória atípica são células que normalmente são encontradas após vacinações, e elas expressam altos níveis de receptores inibitórios e BCR mutado, além de possuir capacidade limitada de se diferenciar em plasmócitos secretores de anticorpos após estimulação de BCR *in vitro*. Isso sugere que essas células são efectoras, mas que declinam com o passar do tempo e não possuem capacidade de produzir anticorpos específicos de alta afinidade (SUTTON et al., 2021).

Finalmente, ao avaliarmos os padrões de conectividade entre as subpopulações de linfócitos analisadas e os fatores solúveis dosados, conseguimos detectar perfis muito diferentes de correlação ao compararmos os dias 0, 7 e 10 após a imunização. Antes da vacina, quando o indivíduo se encontra no estado fisiológico, as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ são as principais responsáveis pelas conectividades com os fatores solúveis. No entanto, com o passar dos dias, a intensidade e a origem das conectividades vão se alterando, até que 10 dias após a imunização os linfócitos B são os principais responsáveis pelas conectividades com os fatores solúveis analisados, e a grande maioria dessas correlações são positivas. Essa alteração corrobora com os resultados encontrados na imunofenotipagem celular dos indivíduos, nos quais foram evidenciados maior proporção de linfócitos B de memória clássica, 10 dias após a

imunização, se associando positivamente com vários dos fatores solúveis avaliados. Essas conexões sugerem que os linfócitos B estão sendo ativados, possivelmente com o auxílio de células T e fatores solúveis, e produzindo anticorpos específicos contra o vírus que conferirão proteção mediante infecção.

6. CONCLUSÃO

Nossos achados demonstram que a dose fracionada da vacina contra a febre amarela é capaz de induzir uma resposta imune adaptativa robusta, com indução de quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de linfócitos e pela ativação de subpopulações de linfócitos T que possuem papel importante no controle de infecções virais, como linfócitos Th1 e CTL. Além disso, a vacinação estimula a proliferação de linfócitos Tfh, células especializadas em auxiliar respostas de células B de memória e plasmócitos, responsáveis pela produção de anticorpos neutralizantes e IgG específicos de alta afinidade.

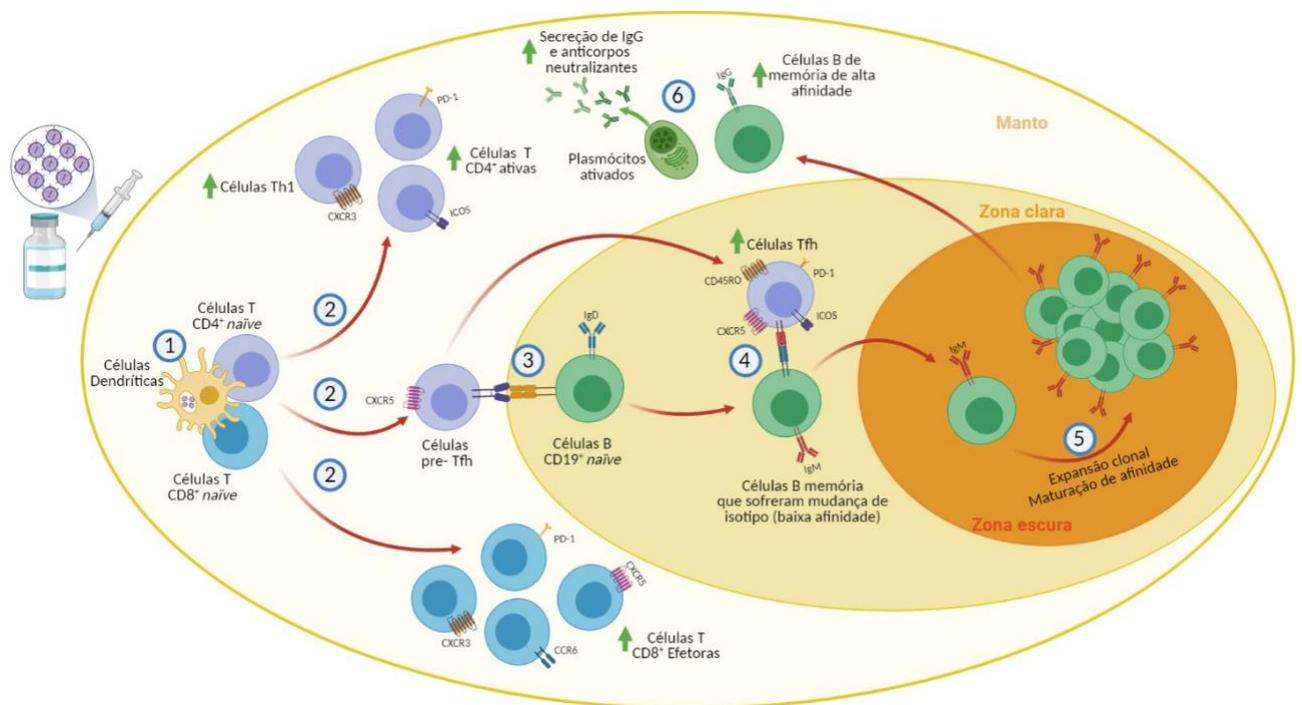


Figura 11 – Resumo gráfico. A dose fracionada da vacina contra a febre amarela foi capaz de induzir maior ativação de linfócitos T CD4+, elevando a proporção de linfócitos Th1 circulantes, além de aumentar a porcentagem de linfócitos T CD8+ ativados. As células T foliculares auxiliares também são encontradas em maior quantidade após a imunização, e essas células são responsáveis por estimular a proliferação de células B de memória de alta afinidade e de plasmócitos produtores de anticorpos específicos contra o vírus da febre amarela. A secreção de anticorpos neutralizantes e IgG específicos contra o vírus também é elevada após a imunização.

7. REFERÊNCIAS

- AHMED, Q. A.; MEMISH, Z. A. Yellow fever from Angola and Congo: a storm gathers. **Tropical Doctor**, v. 47, n. 2, p. 92–96, 1 abr. 2017.
- AHN, E. et al. Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 18, p. 4749–4754, 1 maio 2018.
- AKONDY, R. S. et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 12, p. 7919–7930, 15 dez. 2009.
- ANSEL, K. M. et al. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 8, p. 1123–1134, 18 out. 1999.
- BENTEBIBEL, S.-E. et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. **Science translational medicine**, v. 5, n. 176, p. 176ra32-176ra32, 13 mar. 2013.
- BÉRENGER-FÉRAUD, L. J. B. **De la fièvre jaune à la Martinique (Antilles françaises): étude faite dans les hôpitaux militaires de la colonie.** [s.l.] Delahaye, 1878.
- 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 LP – 2158, 1 mar. 2013.
- BRADHAM, C. A. et al. I. TNF-induced liver injury. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 275, n. 3, p. G387–G392, 1 set. 1998.
- BRENNAN, E. et al. CD4+ T Follicular Helper Cells in Human Tonsils and Blood Are Clonally Convergent but Divergent from Non-Tfh CD4+ Cells. **Cell Reports**, v. 30, n. 1, p. 137- 152.e5, 2020.
- CALLENDER, D. M. Management and control of yellow fever virus: Brazilian outbreak January-April, 2018. **Global Public Health**, v. 14, n. 3, p. 445–455, 4 mar. 2019.
- CAMPI-AZEVEDO, A. C. et al. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 391, 2014.
- CAMPI-AZEVEDO, A. C. et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 12, n. 2, p. 491–502, 2016.
- CAMPI-AZEVEDO, A. C. et al. 17DD Yellow Fever Revaccination and Heightened Long-Term Immunity in Populations of Disease-Endemic Areas, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 8, p. 1511–1521, ago. 2019.
- CANBAY, A. et al. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. **Hepatology**, v. 38, n. 5, p. 1188–1198, 2003.
- CAREY, M. **A Short Account of the Plague: Or Malignant Fever Lately Prevalent in Philadelphia: with a Statement of the Proceedings that Took Place on the Subject in Different Parts of the United States.** [s.l.] Reprinted for Darton and Harvey, 1794.
- CASEY, R. M. et al. Immunogenicity of Fractional-Dose Vaccine during a Yellow Fever Outbreak — Final Report. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 5, p. 444–454, 14 fev. 2018.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Yellow Fever.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/yellowfever/index.html>>. Acesso em: 20 ago. 2020.
- CHAVELE, K.-M.; MERRY, E.; EHRENSTEIN, M. R. Cutting Edge: Circulating Plasmablasts Induce the Differentiation of Human T Follicular Helper Cells via IL-6 Production. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 6, p. 2482–2485, 2015.

- CHTANOVA, T. et al. T Follicular Helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help for B Cells. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 1, p. 68 LP – 78, 1 jul. 2004.
- 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, maio 2016.
- COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771 LP – 5777, 1 maio 2008.
- CROTTY, S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. **Immunity**, v. 41, n. 4, p. 529–542, 16 out. 2014.
- DA COSTA-ROCHA, I. A. 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, 21 jun. 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, 2009.
- DA ROCHA PITTA, S. **Historia da America Portuguesa**. [s.l.] Oficina de Joseph Antonio da Silva, 1730.
- DE BRITO, T. et al. Human fatal yellow fever. Immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart. **Pathology, research and practice**, v. 188, n. 1–2, p. 177–181, fev. 1992.
- DE COGOLLUDO, D. L. **Historia de Yucatan**. [s.l.] M. Aldana Rivas, 1867.
- DE LA PEZUELA, J. **Historia de la isla de Cuba**. [s.l.] C. Bailly-Baillière, 1868.
- 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, 31 jan. 2013.
- DE MENEZES MARTINS, R. et al. Duration of post-vaccination immunity to yellow fever in volunteers eight years after a dose-response study. **Vaccine**, v. 36, n. 28, p. 4112–4117, 27 jun. 2018.
- DE SOUZA LOPES, O.; DE ALMEIDA GUIMARÃES, S. S. D.; DE CARVALHO, R. Studies on yellow fever vaccine III—dose response in volunteers. **Journal of Biological Standardization**, v. 16, n. 2, p. 77–82, 1988.
- DE VILLALBA, J. **Epidemiología española, ó, Historia cronológica de las pestes, contagios, epidemias y epizootias que han acaecido en España desde la venida de los cartagineses hasta el año 1801: con noticia de algunas otras enfermedades de esta especie que han sufrido lo**. [s.l.] Imprenta de Fermín Villalpando, 1803.
- DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 4, p. 915–924, 1 out. 1991a.
- DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209–1220, 1 nov. 1991b.
- DE WAAL MALEFYT, R. et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 11, p. 6370 LP – 6381, 1 dez. 1993.
- DOMINGO, C. et al. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4054–4060, dez. 2012.
- DOMINGO, C. et al. Yellow fever in the diagnostics laboratory. **Emerging microbes &**

infections, v. 7, n. 1, p. 129, 12 jul. 2018.

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, 1 nov. 2018.

DU TERTRE, J. B. **Histoire generale des Antilles habitées par les François ...: L’histoire natvrelle**. [s.l.] Chez Thomas Iolly, au Palais, en la Salle des Merciers, à la Palme, & aux Armes d’Hollande, 1667.

ESCADAFAL, C. et al. Rapid molecular assays for the detection of yellow fever virus in low-resource settings. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 3, p. e2730–e2730, 6 mar. 2014.

ESCHE, C.; STELLATO, C.; BECK, L. A. Chemokines: Key Players in Innate and Adaptive Immunity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 4, p. 615–628, 2005.

FARIA, N. R. et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. **Science**, v. 361, n. 6405, p. 894–899, 2018.

FINLAY, C. J. El Mosquito Hipotéticamente considerado como Agente de Transmisión de la Fiebre Amarilla. 1881.

FREIRE, M. S. et al. Production of yellow fever 17DD vaccine virus in primary culture of chicken embryo fibroblasts: yields, thermo and genetic stability, attenuation and immunogenicity. **Vaccine**, v. 23, n. 19, p. 2501–2512, 2005.

FUERTES MARRACO, S. A. et al. Long-lasting stem cell–like memory CD8⁺ T cells with a naïve-like profile upon yellow fever vaccination. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 282, p. 282ra48 LP-282ra48, 8 abr. 2015.

GALLER, R. et al. Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains. **Vaccine**, v. 16, n. 9, p. 1024–1028, 1998.

GAUCHER, D. et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 13, p. 3119–3131, 22 dez. 2008.

GOOD-JACOBSON, K. L. et al. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. **Nature immunology**, v. 11, n. 6, p. 535–542, jun. 2010.

GROOM, J. R.; LUSTER, A. D. CXCR3 in T cell function. **Experimental cell research**, v. 317, n. 5, p. 620–631, 10 mar. 2011.

GULLAND, A. 14 million people in central Africa to be vaccinated to try to halt yellow fever outbreak. **BMJ**, v. 354, p. i4559, 17 ago. 2016.

HAAGEN, E.; THEILER, M. Studies of Yellow Fever Virus in Tissue Culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 29, n. 4, p. 435–436, 1 jan. 1932.

HACKER, U. T. et al. In Vivo Synthesis of Tumor Necrosis Factor- α in Healthy Humans after Live Yellow Fever Vaccination. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 3, p. 774–778, 1 mar. 1998.

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.

HAVENAR-DAUGHTON, C. et al. CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 10, p. 2702–2707, 8 mar. 2016.

HEIT, A. et al. Vaccination establishes clonal relatives of germinal center T cells in the blood of humans. **The Journal of experimental medicine**, v. 214, n. 7, p. 2139–2152, 3 jul. 2017.

HINDLE, E. Yellow Fever: an Epidemiological and Historical Study of its Place of Origin. **Nature**, v. 130, n. 3287, p. 646–647, 1932.

HUBER, J. E. et al. Dynamic changes in circulating T follicular helper cell composition predict neutralising antibody responses after yellow fever vaccination. **Clinical &**

- translational immunology**, v. 9, n. 5, p. e1129–e1129, 13 maio 2020.
- HUGHES, G. **The Natural History of Barbados**. [s.l.] Arno Press, 1750.
- HUTLOFF, A. et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. **Nature**, v. 402, n. 6763, p. 21–24, 1999.
- JACOBSON, N. G. et al. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. **The Journal of experimental medicine**, v. 181, n. 5, p. 1755–1762, 1 maio 1995.
- JULANDER, J. G. Animal models of yellow fever and their application in clinical research. **Current Opinion in Virology**, v. 18, p. 64–69, 2016.
- KALIA, V. et al. Differentiation of memory B and T cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 3, p. 255–264, 2006.
- KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, ago. 1972.
- KLOTZ, O.; BELT, T. H. The Pathology of the Liver in Yellow Fiver. **The American journal of pathology**, v. 6, n. 6, p. 663- 688.1, nov. 1930.
- KOHLER, S. et al. The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 9, p. 2363–2373, 1 set. 2012.
- KUBO, M.; MOTOMURA, Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 275, 30 ago. 2012.
- LAIDLAW, B. J. et al. Interleukin-10 from CD4(+) follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. **Science immunology**, v. 2, n. 16, p. ean4767, 20 out. 2017.
- LEVY, Y.; BROUET, J. C. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. **The Journal of clinical investigation**, v. 93, n. 1, p. 424–428, jan. 1994.
- LI, M. O. et al. TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β REGULATION OF IMMUNE RESPONSES. **Annual Review of Immunology**, v. 24, n. 1, p. 99–146, 21 mar. 2006.
- LÖHNING, M. et al. Expression of ICOS In Vivo Defines CD4+ Effector T Cells with High Inflammatory Potential and a Strong Bias for Secretion of Interleukin 10 . **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 2, p. 181–193, 13 jan. 2003.
- LOW, J. G. et al. Phase 1 Trial of a Therapeutic Anti–Yellow Fever Virus Human Antibody. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 5, p. 452–459, 2020.
- LUIZA-SILVA, M. et al. Cytokine Signatures of Innate and Adaptive Immunity in 17DD Yellow Fever Vaccinated Children and Its Association With the Level of Neutralizing Antibody. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 873–883, 15 set. 2011.
- MA, W.-T. et al. The protective and pathogenic roles of IL-17 in viral infections: friend or foe? **Open biology**, v. 9, n. 7, p. 190109, 26 jul. 2019.
- MALOY, K. J. et al. CD4(+) T cell subsets during virus infection. Protective capacity depends on effector cytokine secretion and on migratory capability. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 12, p. 2159–2170, 19 jun. 2000.
- MARTINS, M. A. et al. Activation/modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization? **Clinical and experimental immunology**, v. 148, n. 1, p. 90–100, abr. 2007.
- 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, 2008.
- MARTINS, R. M. et al. 17DD yellow fever vaccine: a double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 9, n. 4, p. 879–888, abr. 2013.

- MARUYAMA, M.; LAM, K.-P.; RAJEWSKY, K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. **Nature**, v. 407, n. 6804, p. 636–642, 2000.
- MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J. T Cells Doing It for Themselves: TGF- β Regulation of Th1 and Th17 Cells. **Immunity**, v. 26, n. 5, p. 547–549, 2007.
- MITCHELL, R. E. et al. IL-4 enhances IL-10 production in Th1 cells: implications for Th1 and Th2 regulation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11315, 2017.
- MOCELLIN, S. et al. The dual role of IL-10. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 1, p. 36–43, 2003.
- MONATH, T. P. Yellow Fever: A Medically Neglected Disease. Report on a Seminar. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 165–175, 1 jan. 1987.
- MONATH, T. P. Facing up to re-emergence of urban yellow fever. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1541, 8 maio 1999.
- MONATH, T. P. Yellow fever vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 4, n. 4, p. 553–574, 1 ago. 2005.
- MONATH, T. P. Treatment of yellow fever. **Antiviral Research**, v. 78, n. 1, p. 116–124, 2008.
- MONATH, T. P.; BARRETT, A. D. T. B. T.-A. IN V. R. Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever. In: [s.l.] Academic Press, 2003. v. 60p. 343–395.
- MONATH, T. P.; NYSTROM, R. R. Detection of Yellow Fever Virus in Serum by Enzyme Immunoassay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 1, p. 151–157, 1984.
- MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, 2015.
- MORITA, R. et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. **Immunity**, v. 34, n. 1, p. 108–121, 28 jan. 2011.
- NOGUCHI, H. ETIOLOGY OF YELLOW FEVER : IX. MOSQUITOES IN RELATION TO YELLOW FEVER. . **Journal of Experimental Medicine**, v. 30, n. 4, p. 401–410, 1 out. 1919.
- NUNES, M. R. T. et al. Evaluation of two molecular methods for the detection of Yellow fever virus genome. **Journal of virological methods**, v. 174, n. 1–2, p. 29–34, jun. 2011.
- NURIEVA, R. I. et al. Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. **Immunity**, v. 29, n. 1, p. 138–149, 18 jul. 2008.
- OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 4, 2000.
- ORTIZ-MARTÍNEZ, Y.; PATIÑO-BARBOSA, A. M.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Yellow fever in the Americas: the growing concern about new epidemics [version 2; peer review: 2 approved]. **F1000Research**, v. 6, n. 398, 2017.
- PAPILLION, A. et al. Inhibition of IL-2 responsiveness by IL-6 is required for the generation of GC-TFH cells. **Science Immunology**, v. 4, n. 39, 2019.
- POWELL, J. R.; GLORIA-SORIA, A.; KOTSAKIOZI, P. Recent History of *Aedes aegypti*: Vector Genomics and Epidemiology Records. **Bioscience**, v. 68, n. 11, p. 854–860, 1 nov. 2018.
- QUARESMA, J. A. S. et al. Revisiting the liver in human yellow fever: Virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- β , TNF- α and NK cells activity. **Virology**, v. 345, n. 1, p. 22–30, 2006.
- QUARESMA, J. A. S. et al. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. **Reviews in**

medical virology, v. 23, n. 5, p. 305–318, set. 2013.

QUARESMA, J. A. S.; DUARTE, M. I. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Midzonal lesions in yellow fever: A specific pattern of liver injury caused by direct virus action and in situ inflammatory response. **Medical Hypotheses**, v. 67, n. 3, p. 618–621, 2006.

RASHEED, A.-U. et al. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5hiICOShi CD4 T cells and is independent of CD57 expression. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 7, p. 1892–1903, 1 jul. 2006.

REED, W.; CARROLL, J. A. S.; AGRAMONTE, A. THE ETIOLOGY OF YELLOW FEVER.: AN ADDITIONAL NOTE. **Journal of the American Medical Association**, v. XXXVI, n. 7, p. 431–440, 16 fev. 1901.

REINHARDT, B. et al. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: A model of human flavivirus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 56, n. 2, p. 159–167, 1 out. 1998.

REZENDE, I. M. DE et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006538, 4 jun. 2018.

ROGERS, D. J. et al. The global distribution of yellow fever and dengue. **Advances in parasitology**, v. 62, p. 181–220, 2006.

ROUKENS, A. H. et al. Intradermally Administered Yellow Fever Vaccine at Reduced Dose Induces a Protective Immune Response: A Randomized Controlled Non-Inferiority Trial. **PLOS ONE**, v. 3, n. 4, p. e1993, 23 abr. 2008.

ROUKENS, A. H. E. et al. Long-Term Protection After Fractional-Dose Yellow Fever Vaccination. **Annals of Internal Medicine**, v. 169, n. 11, p. 761–765, 27 nov. 2018.

SARAIVA, M. et al. Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 209–219, 21 ago. 2009.

SCHAERLI, P.; LOETSCHER, P.; MOSER, B. Cutting Edge: Induction of Follicular Homing Precedes Effector Th Cell Development. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6082 LP – 6086, 1 dez. 2001.

SCHMITT, N.; BENTEBIBEL, S.-E.; UENO, H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. **Trends in immunology**, v. 35, n. 9, p. 436–442, set. 2014.

SCHWARTZ, E. et al. Evaluation of ELISA-based sero-diagnosis of dengue fever in travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 19, n. 3, p. 169–173, 2000.

SHAH, H. B. et al. Insights From Analysis of Human Antigen-Specific Memory B Cell Repertoires. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 3064, 15 jan. 2019.

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.

SHI, J. et al. PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function. **Immunity**, v. 49, n. 2, p. 264–274.e4, 21 ago. 2018.

SILVA, M. L. et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. **Vaccine**, v. 29, n. 3, p. 583–592, 2011.

SIMÕES, M. et al. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. **Biologicals**, v. 40, n. 6, p. 399–404, 2012.

SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. The chemokine system in innate immunity. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 5, p. a016303, 29 jan. 2015.

STAPLES, J. E.; MONATH, T. P. Yellow Fever: 100 Years of Discovery. **JAMA**, v. 300, n. 8, p. 960–962, 27 ago. 2008.

- STIPP, S. R. et al. Timing of CD8 T cell effector responses in viral infections. **Royal Society open science**, v. 3, n. 2, p. 150661, 17 fev. 2016.
- STOKES, A.; BAUER, J. H.; HUDSON, N. P. Experimental Transmission of Yellow Fever to Laboratory Animals. **The American Journal of Tropical Medicine**, v. s1-8, n. 2, p. 103–164, 1928a.
- 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. 1928b.
- SUTTON, H. J. et al. Atypical B cells are part of an alternative lineage of B cells that participates in responses to vaccination and infection in humans. **Cell Reports**, v. 34, n. 6, p. 108684, 2021.
- TER MEULEN, J. et al. Activation of the cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever. **The Journal of infectious diseases**, v. 190, n. 10, p. 1821–1827, nov. 2004.
- THEILER, M. Studies on the Action of Yellow Fever Virus in Mice. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 249–272, 8 jul. 1930.
- THEILER, M.; SMITH, H. H. THE EFFECT OF PROLONGED CULTIVATION IN VITRO UPON THE PATHOGENICITY OF YELLOW FEVER VIRUS. **The Journal of experimental medicine**, v. 65, n. 6, p. 767–786, 31 maio 1937a.
- 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 1937b.
- THOMAS, D.; LOPEZ, A. F. **Haematopoietic Growth Factors**LS: Major Reference Works., 15 jul. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001287.pub3>>
- TRUMPFHELLER, C. et al. Expression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta, and RANTES genes in lymph nodes from HIV+ individuals: correlation with a Th1-type cytokine response. **Clinical and experimental immunology**, v. 112, n. 1, p. 92–99, abr. 1998.
- TSE, S.-W. et al. The chemokine receptor CXCR6 is required for the maintenance of liver memory CD8⁺ T cells specific for infectious pathogens. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. 9, p. 1508–1516, 1 nov. 2014.
- VALENTINE, K. M.; HOYER, K. K. **CXCR5+ CD8 T Cells: Protective or Pathogenic?** **Frontiers in Immunology**, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01322>>
- VISSER, L. G. Fractional-dose yellow fever vaccination: how much more can we do with less? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. Publish Ah, 2019.
- WANG, X. et al. Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 12, p. 2497–2510, 21 nov. 2011.
- WEC, A. Z. et al. Longitudinal dynamics of the human B cell response to the yellow fever 17D vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 12, p. 6675–6685, 24 mar. 2020.
- WHITMIRE, J. K. Induction and function of virus-specific CD4⁺ T cell responses. **Virology**, v. 411, n. 2, p. 216–228, 2011.
- WHO- Global Strategy to Eliminate Yellow fever Epidemics (EYE)**. Disponível em: <https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2016/october/2_EYE_Strategy.pdf>. Acesso em: 8 mar. 2021.
- WHO - EYE Strategy**. Disponível em: <<https://www.who.int/initiatives/eye-strategy>>. Acesso em: 8 mar. 2021.

WHO Expert Committee On Biological Standardization Annex I - Requirements for Yellow Fever Vaccine. . [s.l: s.n.]. Disponível em:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37954/WHO_TRS_594.pdf?sequence=1>.

World Health Organization - Fractional dose yellow fever vaccine as a dose-sparing option for outbreak response. . [s.l: s.n.]. Disponível em:

<<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246236/WHO-YF-SAGE-16.1-eng.pdf;jsessionid=3A0B32C4DACAA3D0BFAEE1A4FF0A609F?sequence=1>>.

World Health Organization (WHO) - Yellow Fever Fact Sheet. Disponível em:

<<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>>. Acesso em: 20 ago. 2020.

WRAMMERT, J. et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. **Nature**, v. 453, n. 7195, p. 667–671, 29 maio 2008.

YU, D. et al. The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. **Immunity**, v. 31, n. 3, p. 457–468, 2009.

YU, D.; YE, L. A Portrait of CXCR5+ Follicular Cytotoxic CD8+ T cells. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 12, p. 965–979, 2018.

ZHOU, M. et al. The effect of aging on the frequency, phenotype and cytokine production of human blood CD4 + CXCR5 + T follicular helper cells: comparison of aged and young subjects. **Immunity & Ageing**, v. 11, n. 1, p. 12, 2014.