

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Nayara Ferreira de Paula

IMUNOGENICIDADE E SEGURANÇA DA VACINA DE FEBRE AMARELA 17DD
ATENUADA EM PRIMATAS NEOTROPICAIS

Belo Horizonte

2024

Nayara Ferreira de Paula

**IMUNOGENICIDADE E SEGURANÇA DA VACINA DE FEBRE AMARELA 17DD
ATENUADA EM PRIMATAS NEOTROPICAIS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

Coorientadora: Profa. Ayisa Rodrigues de Oliveira

Belo Horizonte

2024

P324i Paula, Nayara Ferreira de, 1995 -
Imunogenicidade e segurança da vacina de febre amarela 17DD atenuada em primatas neotropicais/ Nayara Ferreira de Paula. – 2024.
39f: il.

Orientador: Renato de Lima Santos
Coorientadora: Ayisa Rodrigues de Oliveira
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.
Área de concentração: Patologia Animal.
Bibliografia: f. 37- 39

1. Animais selvagens – Doenças - Teses - 2. Ciência Animal - Teses -
I. Santos, Renato de Lima - II. Oliveira, Ayisa Rodrigues de -
III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária –
IV. Título

CDD – 639.3

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

NAYARA FERREIRA DE PAULA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Patologia Animal.

Aprovado(a) em 08 de fevereiro de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Renato de Lima Santos - Orientador(a)

Dr.(a). Marcos da Silva Freire

Dr.(a). Juliana Mariotti Guerra



Documento assinado eletronicamente por **Renato de Lima Santos, Professor do Magistério Superior**, em 08/02/2024, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Mariotti Guerra, Usuária Externa**, em 21/02/2024, às 14:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos da Silva Freire, Usuário Externo**, em 21/02/2024, às 14:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2994255** e o código CRC **0ADE1CC4**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - NAYARA FERREIRA DE PAULA

Às 09:00 horas do dia 08 de fevereiro de 2024, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

“IMUNOGENICIDADE E SEGURANÇA DA VACINA DE FEBRE AMARELA 17DD ATENUADA EM PRIMATAS NEOTROPICAIS”

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Patologia Animal**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Renato de Lima Santos**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

| Examinador / Prof. (a) / Dr. (a) | Aprovado(a) | Reprovado(a) |
|---|--------------------|---------------------|
| Renato de Lima Santos | X | |
| Marcos da Silva Freire | X | |
| Juliana Mariotti Guerra | X | |

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 08 de fevereiro de 2024.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Renato de Lima Santos, Professor do Magistério Superior**, em 08/02/2024, às 12:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Mariotti Guerra, Usuária Externa**, em 21/02/2024, às 13:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos da Silva Freire, Usuário Externo**, em 21/02/2024, às 14:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2994196** e o código CRC **573D8684**.

À minha mãe que sempre com muito orgulho e dedicação, se absteve de si para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de iniciar meus agradecimentos sem ser para Deus, que me ilumina, guia e rege todas as etapas da minha vida. E permitiu o enorme aprendizado e desafios do mestrado. E Nossa Senhora Aparecida, que sempre me cobre com seu manto sagrado, me guarda e protege.

Gostaria de agradecer e dedicar toda essa vivência à minha família, meus pais Stela e Marcelo (*in memoriam*), meus tios Duda, Luiz e Zé (*in memoriam*) e minha prima Juliana. Obrigada por sempre apoiarem as minhas decisões e por toda ajuda e entrega ao longo destes anos. Se estou onde estou, devo tudo ao esforço, carinho e amor de vocês.

Gostaria de agradecer meus orientadores Professor Renato de Lima Santos, Professora Ayisa Rodrigues de Oliveira e Professora Tatiane Alves da Paixão, pelos exemplos de profissionais e pessoas. Sempre dedicados e dispostos a transmitir seus ensinamentos e conhecimentos

Agradeço também a todos os professores que compõe o setor de Patologia Animal da UFMG que muito me ensinaram e inspiraram (Roselene Ecco, Roberto Maurício Carvalho Guedes, Rogéria Serakides e Natalia de Melo Ocarino). Agradeço também aos técnicos do setor Luiz, Leimar e Valéria que sempre dispostos a ajudar, tornam o trabalho na patologia menos árduo.

Agradeço também em especial aos meus amigos Lucas e Daniel e todos os pós-graduandos que compõem o setor da Patologia Animal, por serem exemplo de profissionais, compartilharem seus conhecimentos e sempre estarem dispostos a saber como estava e transmitir uma palavra de apoio. E principalmente aos amigos que me ajudaram na realização do etograma: Daniel, Lucas, André, Monique, Bruna, Nelson, Laice e Clarissa.

Agradeço também a colaboração e parceria do Laboratório de Tecnologia Imunológica e do Laboratório de Análise Imunomolecular da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), do Laboratório de Patologia Clínica (HV-UFMG) e também do Laboratório de Virologia (ICB-UFMG).

“Eis o meu segredo. Ele é muito simples: somente vemos bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa aguda, causada pelo vírus da febre amarela (VFA), transmitida principalmente por mosquitos e endêmica em áreas tropicais da América do Sul. Os primatas não humanos neotropicais são suscetíveis a infecção, ocorrendo frequentemente como surtos epizooticos. A vacina de FA 17DD atenuada já foi utilizada em bugios e se mostrou eficaz no desenvolvimento de anticorpos neutralizantes contra VFA, sem efeitos adversos ou reversão de virulência e desenvolvimento da doença. Objetivou-se então avaliar o desenvolvimento de resposta imunológica pela indução de anticorpos contra FA em diferentes espécies de primatas neotropicais a partir da vacinação com a cepa do VFA 17DD atenuada. Foram selecionados 24 primatas neotropicais pertencentes ao plantel do zoológico de Belo Horizonte, sendo quatro *Saguinus imperator*, cinco *Lagothrix cana*, cinco *Sapajus xanthosternos*, sete *Alouatta guariba clamitans*, um *Pithecia irrorata*, um *Aotus infulatus* e um *Ateles* sp. A triagem dos animais foi feita a partir de exame clínico, hemograma, perfil bioquímico, RT-PCR para detecção de RNAemia, detecção de anticorpos neutralizantes por microPRNT e ELISA para avaliação de soroconversão, além de análise comportamental por meio de etograma focal dos indivíduos. Todos os indivíduos foram considerados aptos para a vacinação que foi inoculada com dose única, variando em volume de acordo com o porte da espécie. Durante sete dias após a vacinação, os animais foram monitorados e tiveram nova avaliação comportamental. Nos dias 4 e 60 pós imunização foram realizadas avaliações clínicas, hematológicas e bioquímicas, RNAemia, detecção de IgG contra o vírus da FA por ELISA e identificação de soroneutralização. A vacina não produziu manifestações clínicas de FA em nenhum dos primatas. Em 60 dias após a vacinação houve soroconversão dos animais, com produção de anticorpos neutralizantes e IgG contra FA, porém os indivíduos das espécies *L. cana*, *Ateles* sp. e um indivíduo *S. imperator* não produziram anticorpos neutralizantes. O presente trabalho demonstrou o perfil seguro e imunogênico da vacina existente contra FA 17DD em bugios, macacos-prego-do-peito-amarelo, saguis imperadores, macaco da noite e parauacu. Este conhecimento pode apoiar estudos adicionais com outras espécies de primatas suscetíveis e fornecer uma possível solução para controle de epizootias e prevenir a devastação de espécies ameaçadas, sendo importante contribuição para a conservação de espécies ameaçadas, principalmente *ex situ*.

Palavras-chave: flavivírus, primatas não humanos, vacinação, ELISA, RNAemia, anticorpos neutralizantes.

ABSTRACT

Yellow fever (YF) is an acute infectious disease caused by the yellow fever virus (YFV), transmitted mainly by mosquitoes and endemic in tropical areas of South America. Neotropical non-human primates are susceptible to infection, often occurring as outbreaks epizootic. The attenuated FA 17DD vaccine has already been used in howler monkeys and has shown to be effective in developing neutralizing antibodies against YFV, without adverse effects or reversal of virulence and disease development. The goal was then to evaluate the development of an immunological response through the induction of antibodies against YF in different species of neotropical primates after vaccination with the attenuated YFV 17DD strain. 24 neotropical primates belonging to the Belo Horizonte Zoo squad were selected, including four *Saguinus imperator*, five *Lagothrix cana*, five *Sapajus xanthosternos*, seven *Alouatta guariba clamitans*, one *Pithecia irrorata*, one *Aotus infulatus* and one *Ateles* sp. The animals were tracked based on clinical examination, blood count, biochemical profile, RT-PCR to detect RNAemia, detection of neutralizing antibodies by microPRNT and ELISA to assess seroconversion, in addition to behavioral analysis using a focal ethogram of the individuals. All individuals were considered suitable for vaccination and were inoculated with a single dose, varying in volume according to the size of the species. For 7 days after vaccination, the animals were monitored and had their behavior assessed again. On days 4, 60 post-immunization, clinical, hematological and biochemical evaluations, RNAemia, detection of IgG against the YF virus by ELISA and identification of seroneutralization were carried out. The vaccine did not produce clinical manifestations of YF in any of the primates. Within 60 days after vaccination, the animals seroconverted, with the production of neutralizing antibodies and IgG against YF, but individuals of the species *L. cana*, *Ateles* sp. and one *S. imperator* individual did not produce neutralizing antibodies. The present work demonstrated the safe and immunogenic profile of the existing vaccine against YF 17DD in howler monkeys, yellow-breasted capuchins, emperor tamarins, night monkeys and gray monkey saki. This knowledge can support further studies with other susceptible primate species and provide a possible solution for controlling epizootics and preventing the devastation of threatened species, being an important contribution to the conservation of threatened species, mainly *ex situ*.

Keywords: flavivirus, non-human primates, vaccination, ELISA, RNAemia, neutralizing antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fígado de <i>Alouatta</i> sp. (bugio) com infecção por VFA | 17 |
| Figura 2. Delineamento experimental | 23 |
| Figura 3. Etograma de primatas neotropicais antes e depois da vacinação com o VFA 17DD atenuado | 28 |
| Figura 4. Anticorpos IgG detectados em primatas neotropicais vacinados com o vírus da febre amarela 17DD atenuado | 31 |
| Figura 5. Anticorpos neutralizantes detectados em primatas neotropicais vacinados com VFA 17DD atenuado | 32 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FA - Febre Amarela

PNH - Primatas Não Humanos

VFA - Vírus da Febre Amarela

CITES - Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Selvagens

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Aminotransferase

CRPJ - Centro de Primatologia do Rio de Janeiro

UFP - Unidade Formadora de Placa

IFN- γ - Interferon-gama

EAPV - Eventos Adversos pós vacinais

Fiocruz - Fundação Osvaldo Cruz

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade

SC - Subcutâneo

Ct - Ciclos de Quantificação

PRNT - Plaque Reduction Neutralization Test

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

SFB - Soro Fetal Bovino

SBD - Solução Bloqueadora/diluyente

TA - Temperatura ambiente

DPI – Dias pós imunização

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 Aspectos gerais sobre a febre amarela | 14 |
| 2.2 Vírus da febre amarela | 14 |
| 2.3 Lesões macroscópicas e microscópicas | 15 |
| 2.4 Febre amarela em primatas não humanos | 16 |
| 2.5 Vacina 17DD | 17 |
| 2.6 Vacinação de primatas não humanos com a cepa 17DD | 18 |
| 2.7 Medidas de controle | 19 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 Ética | 21 |
| 3.2 Animais | 21 |
| 3.3 Protocolos de contenção | 22 |
| 3.4 Delineamento experimental | 23 |
| 3.5 Avaliação pré-vacinação | 24 |
| 3.6 Vacinação | 24 |
| 3.7 Avaliação pós-vacinação | 25 |
| 3.8 RNAemia | 25 |
| 3.9 Título de anticorpos neutralizantes | 26 |
| 3.10 ELISA | 26 |
| 4. RESULTADOS | 27 |
| 4.1 Etograma | 27 |
| 4.2 Avaliação clínica e saúde | 29 |
| 4.3 RNAemia pós vacinal | 30 |
| 4.4 Imunogenicidade pós vacinal | 30 |
| 5. DISCUSSÃO | 32 |
| 6. CONCLUSÃO | 35 |
| 7. REFERÊNCIAS | 35 |

1. INTRODUÇÃO

A febre amarela (FA) é uma doença hemorrágica, transmitida por mosquitos para seres humanos e primatas não humanos (PNH), causada pelo vírus da febre amarela (VFA). Ocorre em ambientes silvestres e urbanos, onde é transmitido a um hospedeiro suscetível pelos vetores do gênero *Haemagogus* sp. ou *Sabethes* sp., e *Aedes aegypti*, respectivamente (Litvoc *et al.*, 2018). No Brasil, a região amazônica é considerada endemicamente afetada e os surtos ocorrem frequentemente em áreas não endêmicas. O surto mais recente ocorreu principalmente na região sudeste do Brasil de 2016 a 2018, resultando em mais de 1000 casos humanos, com uma taxa de letalidade de 35,1% (Cunha *et al.*, 2019).

Estudos publicados nas últimas décadas demonstraram a suscetibilidade de primatas neotropicais ao VFA. Desde então, a FA tornou-se uma preocupação significativa para conservação das populações das espécies de PNH, principalmente nas regiões não endêmicas em áreas com baixa circulação viral (Bacha e Johanson, 2017). Em contraste, os primatas africanos são altamente resistentes ao VFA e raramente apresentam a doença (Tranquilin *et al.*, 2013). Os primatas neotropicais são divididos em cinco famílias: Callithrichidae, Cebidae, Aotidae, Pitheciidae e Atelidae, totalizando 152 espécies e 204 subespécies. Algumas dessas espécies, pelo menos 36, são endêmicas no Brasil, e todas apresentam algum grau de vulnerabilidade pela Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora Selvagens (CITES) (Rylands *et al.*, 2011).

As lesões mais frequentes em PNH infectados com VFA são alterações hepáticas caracterizadas por necrose mediozonal severa a massiva com lipidose e infiltrado inflamatório discreto incluindo linfócitos, macrófagos, plasmócitos e, raramente, neutrófilos. Sendo que as lesões hepáticas necrotizantes graves foram frequentemente observadas em *Alouatta* sp. (bugios), enquanto *Callithrix* sp. (saguís) desenvolvem lesões hepáticas com menor frequência e intensidade. Além disso, a frequência de infecção por VFA foi significativamente maior em *Alouatta* sp. comparado com *Callithrix* sp. ou *Sapajus* sp. (macacos-prego) (Santos *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2021). Portanto, esses dados sustentam a hipótese de que animais do gênero *Alouatta* sp. são altamente suscetíveis a infecções e lesões induzidas pelo VFA, enquanto *Callithrix* sp. é suscetível à infecção, mas tem menor frequência de lesões atribuíveis ao VFA (Santos *et al.*, 2020).

Durante o ciclo da doença, a morte desses animais geralmente precede casos humanos (Vasconcelos, 2003). Portanto, monitorar a ocorrência de FA em PNH serve como um alerta precoce à circulação viral em uma determinada área, o que deve levar à prevenção por vacinação das populações humanas potencialmente expostas, já que esta é a principal medida preventiva (Bacha e Johanson, 2017).

A vacina contra FA foi desenvolvida ao longo da década de 1930 por Max Theiler e colaboradores e tem sido utilizada com sucesso por mais de 80 anos para controle da doença, sendo segura e fornecendo imunidade ao longo da vida nos humanos. A vacina é produzida em ovos de galinha embrionados livres de patógenos específicos, utilizando um sistema de lote de sementes implementado no início década de 1940 que não teve mudanças significativas até o presente. A vacina comercial contra FA produzida no Brasil exclusivamente pela Fiocruz utiliza a cepa 17DD viva atenuada (Barrett, 2020).

Estudo anterior realizado em bugios revelou desenvolvimento de títulos de anticorpos neutralizantes contra VFA a partir da vacinação com a vacina de FA 17DD atenuada com ausência de efeitos adversos relacionados à vacina ou reversão de virulência e desenvolvimento da doença (Fernandes *et al.*, 2020).

No Brasil, entre dezembro de 2016 e junho de 2017, o surto de FA resultou em 777 casos confirmados em humanos, sendo mais de um terço deles fatais (Faria *et al.*, 2018), e 1412 infecções confirmadas em PNH (Ministério da Saúde, 2017). A alta letalidade persistiu em 2018 (Ministério da Saúde 2018), e teve seu epicentro e início em Minas Gerais (Figueiredo *et al.*, 2018) e abrangeu mais de 2.000 km² (Moreira-Soto *et al.* 2018). Populações inteiras de bugios pretos nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo foram reduzidos a uma fração de seus tamanhos originais e em alguns fragmentos florestais, populações inteiras foram extintas localmente, principalmente em florestas menores (Mendes, 2018).

Foi demonstrada ampla circulação da FA em Minas Gerais, tendo sido detectado o vírus em 298 carcaças de PNH de 49 municípios, tanto em áreas urbanas e rurais, sendo que as mesorregiões com maior número de carcaças positivas para VFA foram as mesmas com maior de casos humanos de FA de 2016 a 2018 (Sacchetto *et al.*, 2020).

O grande número de mortes dos primatas neotropicais em áreas do surto, por vezes levando à extinção das espécies localmente, exemplifica a importância da vacinação dos animais que vivem nessas regiões, seja os mantidos sob cuidados humanos ou os de vida

livre, com o objetivo de prevenção de FA e redução das mortes dos primatas de espécies muitas vezes ameaçadas de extinção (Mendes, 2018).

O objetivo deste estudo foi avaliar a imunogenicidade e segurança do VFA 17DD atenuado em diferentes espécies de primatas neotropicais que compõem o plantel do Jardim Zoológico de Belo Horizonte, Minas Gerais. Caracterizando a resposta imune induzida pela vacina por meio da detecção de títulos de anticorpos neutralizantes e desenvolvimento de anticorpos IgG pós-vacinais. Também foram avaliados parâmetros de reatogenicidade além da avaliação de RNA viral (RNAemia) pós-vacinal. Assim, este estudo gerou informações importantes e de aplicação imediata sobre o uso da vacina comercial contra FA humana para imunização de PNH de parques, santuários, áreas de reservas naturais e zoológicos, contribuindo para a preservação de espécies ameaçadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais sobre a febre amarela

A FA é uma doença hemorrágica viral transmitida por mosquitos para primatas humanos e PNH, causada por um flavivírus, o VFA. Ocorre em ambientes silvestres e urbanos, onde é transmitido a um hospedeiro suscetível pelos vetores do gênero *Haemagogus* sp. e *Sabethes* sp., ou *Aedes aegypti*, respectivamente (Litvoc *et al.*, 2018). A doença apresenta curta duração com gravidade variada, desde casos assintomáticos ou oligossintomáticos até formas graves (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003; Almeida, 2017). Os seres humanos e PNH desenvolvem a doença de forma semelhante, diferindo no tempo de evolução que, em PNH experimentalmente infectados, leva a morte em até uma semana (Romano, 2014). Estima-se que metade dos humanos infectados são assintomáticos (Litvoc *et al.*, 2018), e dos indivíduos que apresentam sintomas, pelo menos 90% dos casos sejam leves ou oligossintomáticos e que apenas 10% apresentam as formas mais graves da doença culminando com óbito (Vasconcelos, 2003). O período de incubação, intervalo da picada do mosquito infectado até o início dos sintomas, varia de 3 a 6 dias, podendo chegar até 10 a 15 dias (Litvoc *et al.*, 2018). Após esse período, os indivíduos infectados apresentam três fases clínicas distintas: a fase virêmica, a fase de remissão e a fase toxêmica (Litvoc *et al.*, 2018).

A leucopenia é a alteração hematológica mais característica, com leucócitos entre 1.500 e 2.500 células/mL e neutropenia relativa (Litvoc *et al.*, 2018). Entretanto, nas fases mais tardias, em alguns casos pode-se observar leucocitose (Litvoc *et al.*, 2018). Comumente não são observadas alterações dos parâmetros da série vermelha, exceto nos indivíduos que

apresentam hemorragia, onde pode ser observada redução do hematócrito e de hemoglobina, além de trombocitopenia (Vasconcelos, 2003). Além das alterações plaquetárias, ocorre a redução de outros fatores de coagulação, principalmente II, V, VII, VIII, IX e X, com aumento dos tempos de coagulação e de protrombina, redução de fibrinogênio e coagulação intravascular disseminada (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003).

Entre as alterações bioquímicas observadas, destaca-se: baixos níveis de proteína C reativa; hiperbilirrubinemia, aumento alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), frequentemente é observado um aumento maior de ALT, devido ao efeito citopático que o vírus pode causar nas células musculares cardíacas e esqueléticas; e aumento de ureia e creatinina (Litvoc *et al.*, 2018; Vasconcelos, 2003). Quando há acometimento renal, além do aumento de ureia e creatinina, também pode ser observado o aumento de proteinúria, além da presença de bilirrubina e de hemácias (Vasconcelos, 2003). Baseado nos sintomas e nas alterações hematológicas e bioquímicas, o quadro clínico pode ser classificado em leve, moderado, grave ou maligno. Em humanos o quadro leve é caracterizado por sintomas, alterações hematológicas e bioquímicas menos intensas que duram até dois dias com rápida recuperação (Litvoc *et al.*, 2018; Vasconcelos, 2003). Nos casos moderados, os sinais clínicos se intensificam e alterações mais específicas podem surgir, como: icterícia, epistaxe e albuminúria, a persistência dos sinais clínicos pode ser de até três dias seguidos de recuperação completa (Vasconcelos, 2003). Nas formas graves, há início abrupto dos sinais clínicos, que consistem em febre elevada, cefaleia intensa e sinal de Faget evidente que é febre elevada acompanhada de bradicardia (Vasconcelos, 2003).

Os casos graves são caracterizados por insuficiência hepática e renal, com icterícia intensa, elevação de bilirrubina, ALT e AST e aumento de ureia e creatinina. Trombocitopenia intensa também pode ocorrer, e nos casos com coagulação intravascular disseminada pode ser observado consumo de fibrinogênio e acúmulo de D-dímeros (Litvoc *et al.*, 2018). A intensidade da hemorragia, além da redução no número de plaquetas, está relacionada ao consumo dos fatores de coagulação, com aumento dos tempos de coagulação e de protrombina, redução de fibrinogênio e coagulação intravascular disseminada (Monath, 2001; Vasconcelos, 2003).

2.2 Vírus da febre amarela

O VFA membro da família Flaviridae, é um vírus RNA do gênero *Flavivirus*, assim como outros vírus que causam doença em seres humanos como, por exemplo, dengue, zika, vírus do Nilo Ocidental (*West Nile*), vírus da encefalite japonesa e vírus de *Saint Louis* (Litvoc

et al., 2018; Vasconcelos 2003; Domingo *et al.*, 2018). Por ser transmitido por artrópodes é considerado um arbovírus (do inglês: *artrophod borne virus*) (Litvoc *et al.*, 2018). O VFA e outros membros da família Flaviridae se enquadram no grupo de doenças denominadas de febres hemorrágicas virais, onde também são incluídos vírus de outras famílias como Togaviridae (Chikungunya) e Filoviridae (Marburg e Ebola) (Ferreira, 2016).

Somente um sorotipo do VFA é reconhecido, porém existem pequenas diferenças genéticas que caracterizam duas cepas americanas e cinco cepas africanas distintas (Vasconcelos, 2003; Mutebi *et al.*, 2001).

O genoma do vírus é constituído por uma fita simples de RNA não segmentado, de polaridade positiva e constituída de 11 kilobases. Possui uma única região codificante (ORF), com cerca de 10.233 nucleotídeos, que codificam as proteínas virais. O vírion mede 25-40 nm e é envolto por um envelope derivado da membrana da célula hospedeira constituído por bicamada lipoprotéica, medindo então 40-50 nm (Vasconcelos, 2003).

A região do ORF no genoma viral é a responsável pela síntese de três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais. As proteínas estruturais codificam o precursor da proteína da membrana (prM), proteína que integra o envelope (E) e a proteína do capsídeo viral (C). As proteínas não estruturais têm como função atividades de regulação e expressão do vírus, que incluem replicação, virulência e patogenicidade (Vasconcelos, 2003). A proteína E, constituinte do envelope viral, é responsável pelas fases iniciais da infecção nas células do hospedeiro, agindo na aderência a membrana das células do hospedeiro e auxiliando na internalização do vírus, sendo também o principal alvo do sistema imunológico do hospedeiro (Monath, 2001).

2.3 Lesões macroscópicas e microscópicas

As alterações macroscópicas e microscópicas observadas tanto em humanos quanto PNH foram semelhantes tanto em indivíduos com desenvolvimento natural da doença quanto em macacos rhesus inoculados experimentalmente (Hudson, 1928c).

A icterícia foi um achado marcante, sendo visualizada nas mucosas externas (conjuntival, oral, prepucial e vaginal), na pele da face, no tecido subcutâneo e no tecido adiposo, na íntima da aorta, na traqueia, na serosa de órgãos da cavidade abdominal e líquidos cavitários (Hudson, 1928a). Hemorragias também foram observadas, principalmente na mucosa gengival próximo a inserção dos dentes, e no sistema digestório, principalmente estômago e intestinos, onde foi observado grande quantidade de sangue no lúmen, por vezes digerido (melena), e hemorragias na mucosa (Hudson, 1928a).

O fígado, principal órgão afetado, apresenta coloração amarelada com consistência friável, muitas vezes com aspecto gorduroso (Hudson, 1928a). Na superfície também podem ser observados inúmeros pontos vermelhos (Engelmann *et al.*, 2014).

As principais lesões microscópicas são necrose de hepatócitos e degeneração vacuolar, compatível com lipidose, tanto em seres humanos quanto em PNH (Hudson, 1928b; Monath, 2001; Vasconcelos, 2003). A necrose dos hepatócitos ocorre primariamente na região mediozonal do lóbulo hepático, se estendendo nos casos mais graves em direção a veia central e ao espaço porta, onde é observada uma quantidade pequena de hepatócitos não necrótico que podem estar degenerados (Stokes *et al.*, 1928). O padrão de distribuição mediozonal da necrose é característico da infecção pelo VFA, devido à replicação do vírus nos hepatócitos dessa região (Monath *et al.*, 1989).

2.4 Febre amarela em primatas não humanos (PNH)

Os PNH, tanto de Velho Mundo quanto neotropicais, são os hospedeiros silvestres primários do VFA. Os primatas africanos são mais resistentes a infecção pelo vírus, provavelmente por terem evoluído junto com o vírus e conseqüentemente não desenvolvendo doença devido a adaptação (Almeida, 2017; Vasconcelos, 2003). Já nas Américas, os PNH são susceptíveis a infecção pelo vírus, sendo os gêneros *Alouatta*, *Aotus*, *Ateles*, *Brachyteles*, *Callithrix*, *Sapajus*, *Lagothrix*, *Pithecia*, *Saguinus* e *Saimiri* hospedeiros potenciais (Almeida, 2017).

As lesões mais frequentes em PNH infectados com VFA são alterações hepáticas caracterizadas por necrose mediozonal severa com inúmeros hepatócitos apoptóticos (historicamente denominados corpúsculos de Councilman Rocha-Lima), lipidose e discreto infiltrado inflamatório incluindo linfócitos, macrófagos, plasmócitos e, raramente, neutrófilos (Figura 1).

As lesões hepáticas necrotizantes graves foram frequentemente observadas em *Alouatta* sp. (bugios), enquanto *Callithrix* sp. (saguis) tiveram alterações hepáticas menos intensas. Necrose hepática massiva com infiltrado inflamatório discreto a moderado e lipidose ocasional, indicando uma manifestação grave da doença, que foi mais observada no indivíduos do gênero *Alouatta* sp., enquanto a ausência de necrose com inflamação discreta e degeneração glicogênica ocasional e não específica, foram as lesões mais observadas em *Callithrix* sp. Esses achados suportam a hipótese de que *Alouatta* sp. são altamente susceptíveis a lesão hepática severa induzida pelo VFA, enquanto *Callithrix* sp. são

resistentes. (Santos *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2021). Portanto, esses dados sustentam a hipótese de que *Alouatta* sp. é altamente suscetível a infecções e lesões induzidas por VFA, enquanto *Callithrix* sp. é suscetível à infecção, mas tem uma menor frequência de lesões induzidas pelo VFA (Santos *et al.*, 2020).

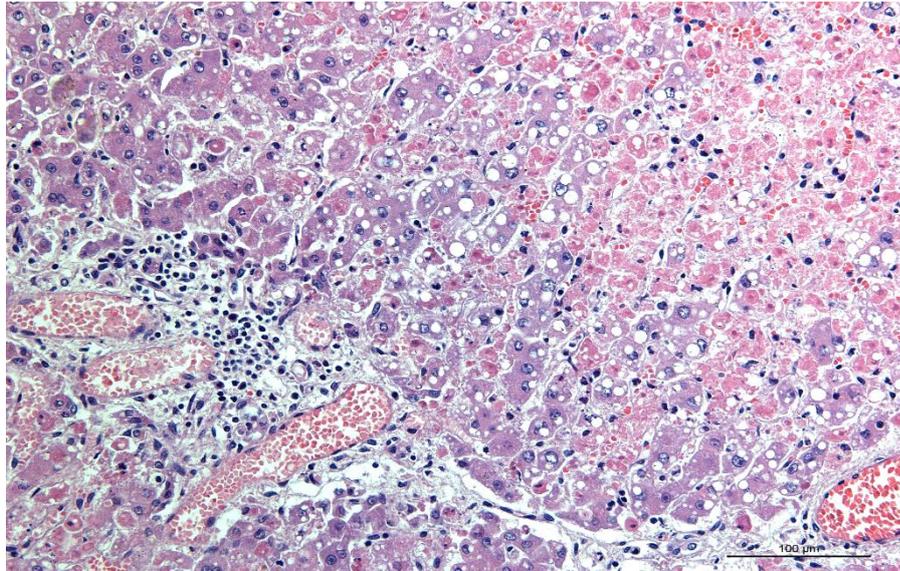


Figura 1. Fígado de *Alouatta* sp. (bugio) com infecção por VFA. Há extensa necrose de hepatócitos na região mediozonal, lipídose de hepatócitos não necróticos e infiltrado discreto de linfócitos, plasmócitos e macrófagos no espaço periportal. HE, 200x. Cedida por: Daniel Oliveira dos Santos.

2.5 Vacina 17DD

O VFA foi isolado pela primeira vez em 1927, a partir de uma amostra de sangue de um jovem africano chamado Asibi (que deu nome ao isolado), que apresentou a forma moderada da doença. Após 176 passagens alternadas do vírus selvagem da cepa Asibi em tecidos de camundongo e embrião de galinha ocorreu a perda do vicerotropismo e competência vetorial, que é a perda da capacidade do vírus ser transmitido pelo vetor (Theiler e Smith, 1937), porém sem reduzir a capacidade de induzir resposta imune protetora em macacos e humanos, resultando na cepa atenuada FA-17D. Várias linhagens derivadas da cepa 17D foram testadas para se alcançar um nível de atenuação com manutenção da imunogenicidade (Benchimol, 2001), sendo usada atualmente em várias regiões ao redor do mundo (Gubler *et al.*, 2007; Staples e Monath, 2008).

A cepa vacinal VFA-17D e a cepa selvagem Asibi diferem entre si em 68 de 10.862 nucleotídeos (aproximadamente 0,63%), que resulta em 32 aminoácidos diferentes. O gene que codifica a proteína E é a região na qual existe o maior número de mutações, correspondendo a 11 nt e oito aminoácidos diferentes (Hahn *et al.*, 1987). A proteína E é relacionada com a penetração do vírus na célula hospedeira, portanto acredita-se que mutações nessa proteína possam ser responsáveis pela alteração de tropismo viral e virulência (Chambers e Nickells, 2001; Mandl *et al.*, 1998; Nickells e Chambers, 2003). As duas sub-cepas vacinais que são usadas atualmente, 17D-204 e 17DD correspondem às passagens 235-240 e 287-289, respectivamente, do vírus selvagem Asibi. Embora possam apresentar diferenças a nível molecular, estudos mostraram que não há diferenças na imunogenicidade entre elas (Lang *et al.*, 1999; Monath *et al.*, 2002). A cepa vacinal utilizada atualmente no Brasil é a 17DD, que compartilha 99,9% de identidade e sequência de ácido nucleico com a 17D-204 (Benchimol, 2001; Melo *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2011; Frierson, 2010).

A vacinação gera altos níveis de proteção, com soroconversão maior que 95% em crianças e adultos e duração da imunidade podendo superar 10 anos. A viremia induzida é relativamente baixa, diminuindo após 4 a 7 dias. Simultaneamente, desenvolve-se uma resposta do tipo IgM que não poderá ser diferenciada para a resposta de IgM induzida por uma infecção natural. Aproximadamente 10 dias após a vacinação, a pessoa é considerada protegida contra uma infecção natural (OMS, 2017).

A vacina contra a febre amarela é indicada para pessoas entre nove meses e 60 anos de idade que residem em áreas de risco e para pessoas que residem em áreas urbanas e vão viajar para regiões de risco. No caso de pessoas com mais de 60 anos que nunca foram vacinadas, o médico deve levar em conta os riscos da vacinação, que incluem o risco de eventos adversos nessa faixa etária ou decorrentes de comorbidades (Fiocruz).

2.6 Vacinação de PNH com a cepa 17DD

Estudo anterior realizado em dez bugios (*Alouatta* sp.), mantidos em cativeiro no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), revelou desenvolvimento de títulos de anticorpos neutralizantes e anticorpos IgG contra VFA a partir da vacinação com a vacina de FA 17DD atenuada, com três diferentes concentrações (2,7 log₁₀, 3,0 log₁₀ e 3,7 log₁₀ unidades formadoras de placas - UFP), com ausência de efeitos adversos relacionados a vacina ou reversão de virulência e desenvolvimento da doença, sendo que houve então soroconversão 60

dias após a imunização e manutenção dos anticorpos nas coletas acima de 365 dias após a imunização (Fernandes *et al.*, 2020). Animais da espécie *Leontopithecus chrysomelas* (mico leão da cara dourada) também estão sendo vacinados com cepa inativada e vacinas de subunidades virais, e têm apresentado desenvolvimento de títulos de anticorpos neutralizantes contra VFA, sendo que esses estudos ainda estão em desenvolvimento, com a publicação de dados preliminares (Fernandes *et al.*, 2019).

A avaliação da resposta de anticorpos neutralizantes em macacos rhesus (*Macaca mulatta*) inoculados com doses fracionadas e diluídas da vacina com a cepa 17D mostrou que a vacina induziu um alto grau de imunogenicidade em 90% dos animais (Mason *et al.*, 1972). As vacinas de maior sucesso fazem parte de uma combinação de resposta, consistindo em níveis persistentes e elevados de anticorpos específicos por células de memória, com resposta celular (Kohler *et al.*, 2012). Estudos anteriores demonstraram que a resposta precoce de interferon-gama (IFN- γ) é crucial para a resposta de anticorpos neutralizantes na vacinação contra FA em macacos rhesus, bem como em humanos, atingindo alta produção 15 dias após a vacinação (Kohler *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2009; Neves *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2013).

2.7 Medidas de controle

O Programa de Vigilância, Prevenção e Controle da Febre Amarela atua de forma articulada com diferentes áreas, como vigilância de casos humanos suspeitos, de síndromes febris íctero-hemorrágicas, imunização, vigilância de eventos adversos pós-vacinais graves (EAPV), vigilância entomológica (vetores urbanos e silvestres), vigilância ambiental (ecoepidemiologia), além de ações de informação, de educação e de comunicação (Brasil, 2017).

Os casos de FA, inclusive os suspeitos ainda com investigação em andamento, devem ser notificados imediatamente para as autoridades sanitárias (Vasconcelos, 2003). São considerados casos suspeitos a ocorrência de PNH de qualquer espécie, encontrado morto (incluindo ossadas) ou doente, em qualquer local do território nacional, sendo que os animais doentes são aqueles com comportamento anormal como, por exemplo: depressão, ausência de instinto de fuga, movimentação lenta (mesmo quando perseguido), segregação do grupo ou imobilidade no solo; e/ou perda de apetite, desnutrição, desidratação, presença de lesões cutâneas, secreções nasais, oculares e diarreia, entre outros sinais clínicos (Brasil, 2017). Além da notificação nacional, surtos de FA, estão sujeitos ao Regulamento Sanitário

Internacional, devendo ser notificados aos países vizinhos para que as medidas de prevenção sejam aplicadas (Vasconcelos, 2003).

As epizootias (identificação de PNH positivos para FA) servem como alerta da ocorrência de circulação viral, e nas áreas onde elas ocorrem devem ser iniciadas medidas de prevenção e controle da doença (Bacha e Johanson, 2017). Para diagnosticar epizootias, devem ser coletados durante a necropsia fragmentos de fígado, baço, pulmão, coração, rim e encéfalo, conservados em solução de formalina a 10%, para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica, e refrigerados/congelados para exames virológicos (Brasil, 2017).

A principal forma de prevenção da doença no ser humano é a vacinação, com a cepa vacinal 17D desenvolvida por Max Theiler em 1937, considerada segura e altamente efetiva, conferindo imunogenicidade de 90 a 98% depois de 10 dias e gerando efeitos adversos graves em 1255 de 333 milhões de doses aplicadas (Litvoc *et al.*, 2018; Staples *et al.*, 2015). As reações à vacina contra FA (atenuada) são geralmente brandas. 2 a 5% dos vacinados podem apresentar cefaléia, mialgia, febre e outros sintomas leves entre o 5º e o 10º dia após a vacinação. A doença viscerotrópica aguda é uma complicação grave, na qual o vírus vacinal dissemina-se para diversos órgãos, resultando em choque, derrame pleural e abdominal, falência múltipla de órgãos e alta letalidade. No Brasil, até o final de 2007, foram registrados 8 casos de eventos adversos graves considerados como doença viscerotrópica aguda (Fiocruz). Os indivíduos vacinados apresentam títulos baixos do vírus na corrente sanguínea nos primeiros dias após a vacinação, porém esses vírus não oferecem risco de transmissão para os vetores já que a cepa vacinal perdeu a capacidade de infectar os mosquitos e a carga viral é baixa (Monath, 2001).

A vacina é contraindicada em indivíduos imunossuprimidos, que passaram por transplante de órgãos há menos de dois anos, histórico de doença tímica, com lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide ou infecção pelo HIV avançada, indivíduos com menos de 9 meses de idade ou com histórico de hipersensibilidade a algum componente da vacina (Litvoc *et al.*, 2018; Staples *et al.*, 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, atualmente é recomendada uma única dose da vacina, modificando a recomendação anterior de revacinação após 10 anos (Litvoc *et al.*, 2018).

Em 2018, durante a epidemia no Brasil, estados como São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia, adotaram a medida utilizada anteriormente em Angola e no Congo entre 2015 e 2016, onde foi utilizada uma dose fracionada da vacina para imunizar maior número de pessoas e a contenção da epidemia foi adequada. Estudos sugerem que a dose fracionada confere os

mesmos níveis de anticorpos que a dose completa, entretanto ainda não se sabe sobre a durabilidade dos mesmos (Litvoc *et al*, 2018).

Outras medidas para o controle da doença incluem o controle dos vetores no ambiente, o que é inviável no meio silvestre, e aplicação de métodos de proteção individual (Vasconcelos, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ética

O protocolo do estudo (nº 159/2022) foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG). Este estudo tem licença ambiental, que foi cedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade do Ministério do Meio Ambiente do Brasil (ICMBio-SISBIO número 83903-1/2022), e autorização da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FU007/2022).

3.2 Animais

Os primatas neotropicais utilizados no projeto e pertencentes ao plantel do Jardim Zoológico de Belo Horizonte incluindo as espécies listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Primatas neotropicais que foram imunizados para febre amarela, suas respectivas espécies, identificações, sexo, idade e peso.

| Identificação | Espécie | Microchip | Sexo | Idade | Peso (kg) |
|---------------|------------------------------|------------|-------|----------|-----------|
| SI01 | <i>Saguinus imperator</i> | 232180 | Macho | 12 anos | 0,615 |
| SI02 | <i>Saguinus imperator</i> | 00064CF8DA | Macho | 14 anos | 0,455 |
| SI03 | <i>Saguinus imperator</i> | 82644296 | Macho | 11 meses | 0,385 |
| SI04 | <i>Saguinus imperator</i> | 252601 | Macho | 4 anos | 0,539 |
| MP01 | <i>Sapajus xanthosternos</i> | 00064D07D0 | Fêmea | 16 anos | 2,78 |
| MP02 | <i>Sapajus xanthosternos</i> | 901293 | Fêmea | 4 anos | 1,8 |

| | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|------------|-------|---------|-------|
| MP03 | <i>Sapajus xanthosternos</i> | 022197 | Macho | 7 anos | 3,9 |
| MP04 | <i>Sapajus xanthosternos</i> | F59F | Fêmea | 13 anos | 3,18 |
| MP05 | <i>Sapajus xanthosternos</i> | 493175 | Macho | 8 anos | 1,8 |
| MB01 | <i>Lagothrix cana</i> | 234113 | Fêmea | 10 anos | 5,76 |
| MB02 | <i>Lagothrix cana</i> | 231264 | Fêmea | 8 anos | 5,9 |
| MB03 | <i>Lagothrix cana</i> | 224298 | Fêmea | 7 anos | 6,065 |
| MB04 | <i>Lagothrix cana</i> | 2643996 | Fêmea | 2 anos | 3,75 |
| MB05 | <i>Lagothrix cana</i> | 203805 | Macho | 8 anos | 8,48 |
| PA01 | <i>Pithecia irrorata</i> | 00064D1804 | Fêmea | 12 anos | 2,79 |
| MN01 | <i>Aotus infulatus</i> | 22194 | Fêmea | 14 anos | 0,905 |
| BU01 | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | 203689 | Fêmea | 9 anos | 3,525 |
| BU02 | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | 023759 | Fêmea | 8 anos | 5,255 |
| BU03 | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | 600ED23 | Fêmea | 18 anos | 3,295 |
| BU04 | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | 023756 | Fêmea | 7 anos | 4,18 |
| BU05 | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | 232191 | Fêmea | 3 anos | 3,715 |
| BU06 | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | 64D1D3E | Macho | 7 anos | 7,765 |
| BU07 | <i>Alouatta guariba clamitans</i> | 2649743 | Fêmea | 9 meses | 1,215 |
| MA01 | <i>Ateles sp.</i> | 204802 | Macho | 10 anos | 8,305 |

Durante o desenvolvimento deste estudo, os animais permaneceram em diversos recintos, que são constituídos por área de exposição e área de manobra, e receberam dieta balanceada baseada principalmente em ração, frutas e legumes.

3.3 Protocolos de contenção

Durante a contenção física cada animal foi contido na área de manobra de cada recinto e capturado com puçá de nylon de tamanho apropriado para cada espécie, em seguida o primata foi contido manualmente com a utilização luva de raspa de couro e/ou luva de procedimento pela equipe técnica do Jardim Zoológico.

Já para a contenção química, cada animal foi mantido em jejum hídrico e alimentar por 12 horas. Após a contenção física anteriormente descrita, os animais das espécies *Saguinus imperator* (saguí imperador), *Pithecia irrorata* (parauacu) e *Aotus infulatus* (macaco da noite) receberam anestésico inalatório a base de isoflurano a 3%. Os animais das espécies *Lagothrix cana* (macaco barrigudo), *Alouatta guariba clamitans* (bugio ruivo), *Sapajus xanthosternos* (macaco-prego-do-peito-amarelo) e *Ateles* sp. (macaco aranha) receberam cetamina a 10% e midazolam a 0,5% nas doses de 5 mg/kg e 0,3 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular, seguido de anestesia inalatória quando necessário.

3.4 Delineamento experimental

Os primatas foram contidos quimicamente para coleta sanguínea por punção venosa das veias femorais e/ou safenas, no volume de até 1% do peso vivo de cada animal, na triagem, que ocorreu 15 dias antes da vacinação (-15 DPI), e também nos dias 4 e 60 pós imunização, 4 DPI e 60 DPI, respectivamente. Já para a vacinação, foram contidos fisicamente e quando necessário, submetidos à contenção química (0 DPI) (Figura 2).

Adicionalmente, análise de comportamento observacional com estipulação de etograma foi realizada por uma semana após a manipulação para a triagem e por uma semana após a vacinação, durante 1 hora pela manhã e 1 hora pela tarde, preferencialmente após o manejo e distribuição de alimentos no recinto sempre nos mesmos horários, realizadas pelo mesmo observador.

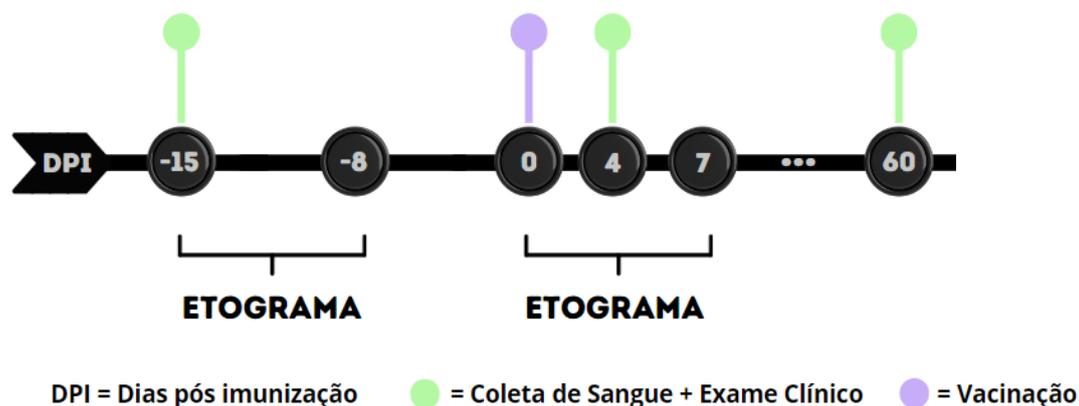


Figura 2. Delineamento experimental. Nos dias -15, 4 e 60 pós imunização foi realizada coleta de sangue e exame clínico de cada um dos animais. No dia 0 ocorreu a vacinação, por via subcutânea na região hipogástrica. Por uma semana após a contenção para a triagem e após a vacinação foi realizado etograma com observação do comportamento.

3.5 Avaliação pré-vacinação

A triagem dos animais imunizados foi realizada quinze dias antes da vacinação (-15 DPI), onde os primatas foram contidos quimicamente para coleta sanguínea por punção venosa das veias femorais e/ou safenas, no volume de até 1% do peso vivo de cada animal, para testagem prévia para VFA por meio de reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). A avaliação clínica de cada animal incluiu aferição das frequências cardíaca e respiratória, de temperatura e peso, hemograma e perfil bioquímico, com mensuração de ureia, creatinina, proteinemia, ALT, AST, fosfatase alcalina e proteína C reativa. A realização dos exames foi a fim de identificar senilidade clínica e verificar as funções hepática e renal, excluindo qualquer possível enfermidade pré-existente. Caso os animais fossem identificados com RNAemia, doença crônica, senilidade clínica, alguma condição debilitante ou menos de 9 meses de idade, estes não seriam vacinados.

A partir da avaliação de comportamento observacional era anotado na ficha a cada 1 minuto as atividades realizadas pelos animais, como por exemplo, movimentação no galho e no chão, repouso, ingestão hídrica e alimentar, defecação, micção e manifestações clínicas, quando observadas, bem como, as características climáticas e possíveis interferências externas nos recintos. Ao final da avaliação foi calculada a frequência de tempo gasto por comportamento, subdividindo-se em comportamentos ativos (movimento no galho e no chão

e cópula), comportamentos não ativos (parado no chão e no galho), ingestão de água, alimentação, micção e defecação.

3.6 Vacinação

A inoculação da vacina foi por via subcutânea (SC) na região hipogástrica com dose única da vacina comercial com a cepa de VFA 17DD viva atenuada, produzida pela Bio-Manguinhos/Fiocruz, Brasil. A dose aplicada foi correspondente a 100 μ L da vacina humana reconstituída nos indivíduos das espécies de maior porte como *L. cana*, *A. guariba clamitans*, *P. irrorata*, *S. xanthosternos* e *Ateles* sp., e de 20 μ L da vacina humana reconstituída nos indivíduos de menor porte como *S. imperator* e *A. infulatus*. As doses foram baseadas nos estudos realizados previamente em *Alouatta* sp. (Fernandes *et al.*, 2020).

A vacinação foi dividida em seis dias não consecutivos, com os animais divididos da seguinte maneira:

- Dia 1: 1 sagui-imperador, 1 macaco barrigudo e 1 macaco-prego-do-peito-amarelo.
- Dia 2: 1 sagui-imperador, 1 macacos barrigudos e 3 macacos-prego-do-peito-amarelo.
- Dia 3: 2 saguis-imperador, 3 macacos barrigudos e 1 macacos-prego-do-peito amarelo.
- Dia 4: 1 macaco-da-noite e 1 parauacu.
- Dia 5: 7 bugios ruivos.
- Dia 6: 1 macaco-aranha.

3.7 Avaliação pós-vacinação

Durante sete dias a partir da imunização, os animais foram monitorados e tiveram nova avaliação comportamental com as mesmas características e anotações da avaliação pré-vacinal. Foram incluídos também parâmetros como: manipulação do sítio de vacinação, sinais clínicos, incluindo vômitos, prostração manifestações hemorrágicas e neurológicas.

Contenções químicas foram realizadas nos 4 e 60 DPI para coleta de amostras de sangue e avaliação clínica para comparação com a avaliação pré-vacinação e avaliação de possíveis alterações clínicas, decorrente da imunização.

Os resultados de etograma foram comparados por análise de variância comparando os comportamentos ativos (movimento no galho e no chão e cópula), comportamentos não ativos

(parado no chão e no galho e não visível), ingestão de água, comendo, micção e defecação, antes e depois da vacinação ($P < 0,05$), com teste de Sidak para comparação múltipla pareada. Enquanto os resultados de hemograma e perfil bioquímico foram avaliados individualmente para observação de alterações hematológicas, e nas espécies com mais de um indivíduo foi realizado o Teste de Friedman (GraphPad Prism versão 8.0.1- GraphPad Software) comparando os valores observados na triagem (-15 DPI), com os tempos após a imunização (4 e 60 DPI) ($P < 0,05$).

3.8 RNAemia

A RNAemia foi quantificada por RT-PCR. O RNA viral foi extraído de amostras de soro correspondentes à -15, 4 e 60 DPI utilizando o kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, GmbH) de acordo com as instruções do fabricante. As fitas foram retrotranscritas usando Transcriptase reversa SuperScript II e primers hexâmeros aleatórios (Invitrogen). Os cDNAs sintetizados, foram então amplificados e quantificados por PCR em tempo real. Para cada corrida de PCR, uma mistura foi preparada com AmpliTaq Gold (Invitrogen), primers e sonda (100 nM cada primer, direto 5'-GCTAATTGAGGTGYATTGGTCTGC-3' e reverso- 5' - CTGCTAATCGCTCAAMGAACG-3', 100 nM sonda 5' FAM-ATCGAGTTGCTAGGCAATAAA CAC-TMR-) - medido por análise fluorométrica. Os ensaios foram realizados em duplicata, e nos resultados finais são consideradas positivas as amostras com ciclos de quantificação (Ct) abaixo de 37, enquanto as negativas apresentam Ct superior a 37 ou não tem amplificação (Domingo *et al.*, 2012).

3.9 Título de anticorpos neutralizantes

Os níveis de anticorpos neutralizantes contra FA foram quantificados por micro-PRNT₅₀ (micro-Plaque Reduction Neutralization Test), a partir de amostras de soros dos animais coletadas durante o período de pré-imunização (-15 DPI), bem como após a imunização dos animais com uma dose da vacina da FA em D4 e D60.

Resumidamente, o micro-PRNT₅₀ foi executado em placas de 96 poços, aproximadamente, 30 unidades formadoras de placa de VFA (UFP) foram adicionados ao soro dos primatas previamente diluídos seriadamente, a partir 1:5 até 1:640, utilizando o fator 2 para a diluição. Em seguida, as placas contendo a mistura soro+VFA foram incubadas em estufa com 5% CO₂ por 1 hora a 37°C. Após esse período, foram adicionadas em cada poço

da placa uma suspensão de células Vero CCL-81 (ATCC) e incubados por 3 horas em estufa com 5% CO₂. O sobrenadante das placas foi descartado e adicionado o meio semissólido (meio 199 suplementado com 5% SFB e 2,5% de CMC (carboximetilcelulose). As placas foram incubadas por seis dias em estufa com 5% CO₂ e a 37°C, e finalmente fixadas com uma solução de formaldeído a 5% e coradas com cristal violeta. As placas foram fotografadas no BioSpot (CTL-Cellular Technology Limited) e as UFP foram quantificadas. O título de anticorpo neutralizante contra FA foi definido em correspondência com a diluição do soro capaz de reduzir o número de placas virais em 50% em relação ao UFP, encontrada no controle do viral. Títulos acima de 1:5 foram considerados positivos para a presença de anticorpos neutralizantes contra FA (Fernandes *et al.*, 2020). Os resultados foram comparados por meio do Teste de Friedman (GraphPad Prism versão 8.0.1; GraphPad Software), ($P < 0,05$).

3.10 ELISA

Para avaliar os níveis de anticorpos IgG contra FA, soros correspondentes a -15, 4 e 60 DPI de todos os animais foram analisados em placas de 96 poços foram revestidas com 2,5 µg/mL, 50 µL/poço de VFA em tampão de revestimento (tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6) e incubadas durante a noite a 4°C. Em seguida, o excesso de anticorpo foi removido. Em todas as etapas de lavagem, as microplacas foram enxaguadas mecanicamente 5 vezes com tampão de lavagem (PBS pH 7,4 com 0,05% de Tween-20 –PBS/T, 300 µL/poço). As placas foram bloqueadas com solução bloqueadora/diluente (SBD) 100 µL/poço (PBS/T, 0,05% BSA, 3% soro fetal bovino (SFB) e 5% leite desnatado), por 1 hora a 37°C. As amostras foram diluídas 1:20 para serem realizadas 4 diluições seriadas de duas vezes, e para a curva padrão, 8 diluições seriadas de duas vezes no SBD do anticorpo anti-yellow fever serum, monkey (YF - NIBSC) variando de 1 a 0,015 mUI/mL. Após 1 hora em temperatura ambiente (TA), a placa foi lavada e incubada com 100 µL/poço de anticorpo IgG Anti-Macaco conjugado com peroxidase (A2054-Sigma) diluído 1:5000 em SBD e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Após a lavagem, 100 µL/poço de solução de substrato (TMB plus™ ke men tec) após 15 minutos, 100 µL/poço de solução de parada (2M H₂SO₄) foram adicionados e as medições de ponto final foram feitas a 450 nm. As absorbâncias das diluições das amostras de soro foram plotadas na curva padrão. Os títulos de anticorpos foram calculados utilizando o software SoftMax Pro® por regressão logística para 4 parâmetros, expressos em UI/mL em relação ao anti-soro de referência. (Fernandes *et al.*, 2020). As

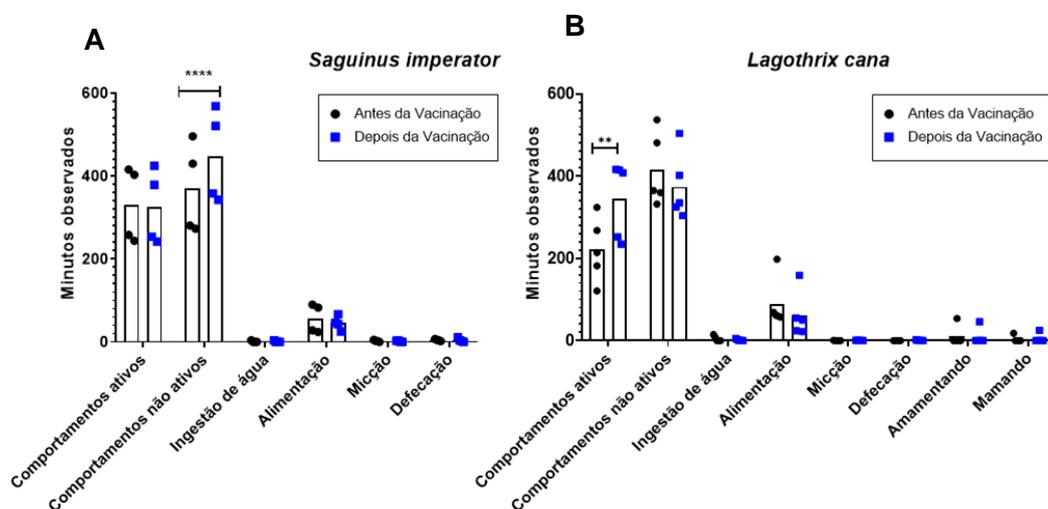
diferenças entre os dias de contenção foram estabelecidas pelo teste de Friedman ($P < 0,0001$).

4. RESULTADOS

4.1 Etograma

Os animais foram avaliados quanto ao seu comportamento em período prévio e posterior a vacinação. Ao final dos períodos de observação foi calculada a frequência de tempo gasto por comportamento, subdividindo-se em comportamentos ativos (movimento no galho e no chão e cópula), comportamentos não ativos (parado no chão e no galho), ingestão de água, alimentação, micção e defecação.

Por meio da análise de variância identificou-se que nos indivíduos da espécie *S. imperator* houve somente diferença na frequência de comportamentos não ativos ($P < 0,0001$), com aumento após a imunização de tempo em que os animais não foram visualizados (Figura 3A). Já nos espécimes *L. cana* houve aumento na frequência dos comportamentos ativos, seja movimento no galho, no chão ou cópula após a imunização ($P < 0,05$) (Figura 3B). Nos animais *S. xanthosternos* não houve diferença quanto aos comportamentos ativos e não ativos, porém no parâmetro de alimentação houve aumento da frequência após a imunização ($P < 0,05$) (Figura 3C). Já nos animais das espécies *A. guariba clamitans*, *A. infulatus*, *P. irrorata* e *Ateles* sp. não houve diferença significativa entre nenhum dos parâmetros analisados (Figuras 3D-3G).



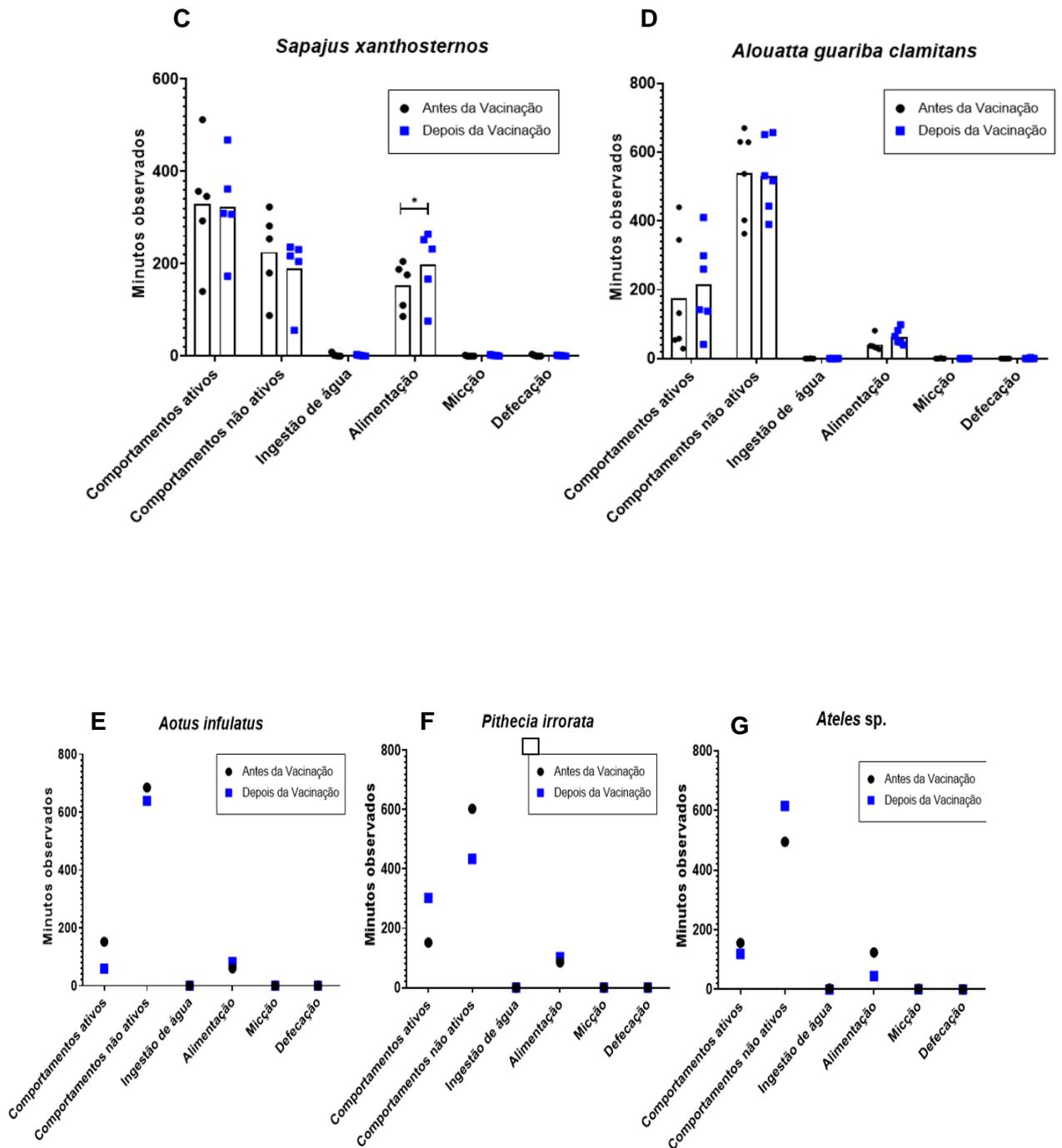


Figura 3. Etograma de primatas neotropicais antes e depois da vacinação com o VFA 17DD atenuado. Frequência de comportamentos observados ao longo de 7 dias antes da vacinação e 7 dias após a vacinação. (A) Nos animais da espécie *S. imperator* houve somente diferença na frequência de comportamentos não ativos antes e após a vacinação ($P < 0,0001$). (B) Nos espécimes *L. cana* houve aumento na frequência dos comportamentos ativos ($P < 0,05$). (C) Nos indivíduos *S. xanthosternos* não houve diferença quanto aos comportamentos ativos e não ativos, porém no parâmetro de alimentação houve aumento da frequência após a imunização ($P < 0,05$). Nos demais grupos de espécies, não houve diferença

significativa (D) *A. guariba clamitans*, (E) *A. infulatus*, (F) *P. irrorata*, (G) *Ateles* sp. As diferenças entre os períodos de observação foram calculadas usando análise de variância com teste de Sidak para comparação múltipla pareada.

Além disso, nas observações individuais não foi observada demonstração de efeito adverso, como por exemplo, prostração, demonstração de dor, maior frequência de consumo de água, que poderia acontecer em caso de febre, menor frequência de consumo de alimentos e manipulação do local da vacina por apresentarem desconforto devido a aplicação.

4.2 Avaliação clínica e de saúde

Além da utilização da análise comportamental como demonstração de efeito adverso, foram realizados exames físicos e avaliação de hemograma e perfil bioquímico, sendo que cada animal foi avaliado individualmente, sendo que as informações obtidas na triagem (-15 DPI) foram utilizadas com controle para comparações após a vacinação. Somente um indivíduo da espécie *A. guariba clamitans* (BU03) estava com sinais clínicos no período pré-vacinação, incluindo diarreia, apatia, leucocitose por neutrofilia e caquexia, sendo então tratada com antimicrobiano (metronidazol), apresentando melhora significativa até o momento da vacinação. Outros diagnósticos como vaginite crônica (MP01) e cisto tubo-ovárico (MP04) foram evidenciados, porém sem nenhuma alteração no quadro clínico geral dos animais, e também não foram considerados impedimento para a imunização.

Em 4 e 60 DPI nenhum animal apresentou alterações com diferença significativa nos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Em 60 dias após a imunização, um sagui imperador (SI02) e dois macacos barrigudos (MB02 e MB03) e um bugio (BU05) apresentaram perda de peso acima de 10% do peso inicial, porém sem outras alterações clínicas.

4.3 RNAemia pós vacinal.

A imunização com a cepa FA 17DD resultou em RNAemia detectável aos 4 DPI, em 9 dos 24 animais (37,5%), sendo três macacos-prego-do-peito-amarelo (MP01, MP02 e MP04), um parauacu (PA01) e cinco bugios (BU01, BU03, BU05, BU06 e BU07). Nos outros tempos de coleta, em nenhum animal houve amplificação do RNA viral.

4.4 Imunogenicidade pós vacinal

Para caracterizar a resposta dos anticorpos induzidos pela vacinação, os soros foram coletados em -15, 4 e 60 DPI e testados para anticorpos neutralizantes e para IgG anti-VFA.

Todos os animais desenvolveram IgG anti-VFA aos 60 DPI (Figura 4), com exceção dos animais MB04 e SI03 (um macaco barrigudo e um sagui imperador), que não desenvolveram soroconversão em nenhum dos tempos de coleta. Os animais PA01, BU03, BU04, BU05, BU06 e MA01 apresentaram detecção de IgG nos tempos -15 DPI e/ou 4 DPI, entretanto, os títulos foram aumentados em 60 DPI ($P < 0,05$), sugerindo soroconversão.

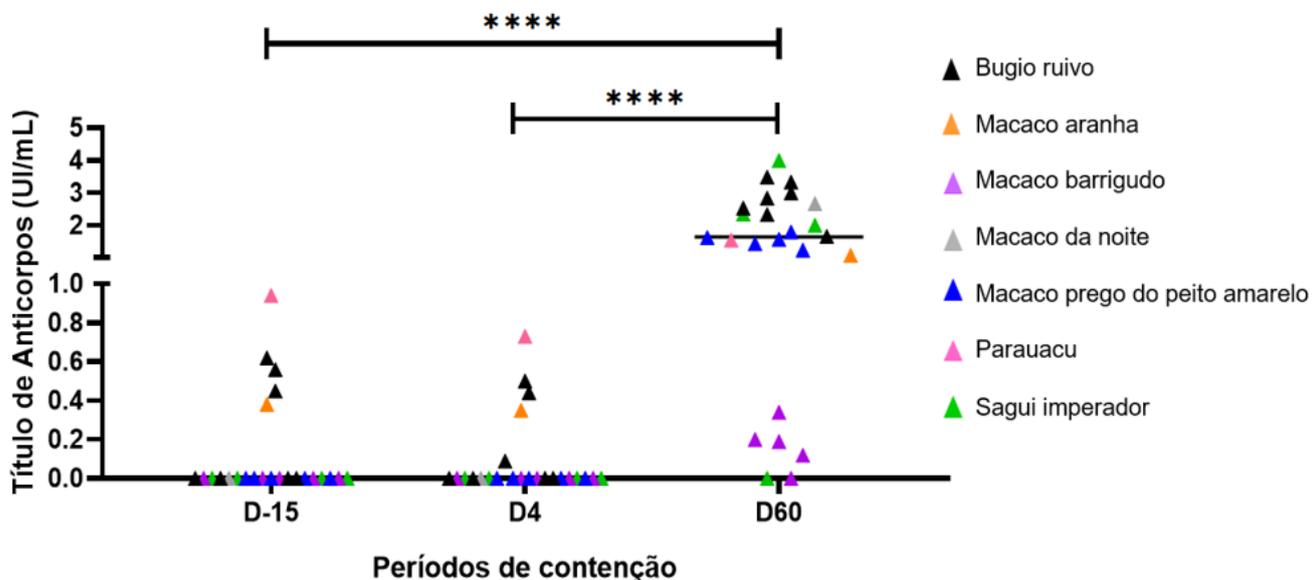


Figura 4. Anticorpos IgG detectados em primatas neotropicais vacinados com o vírus da febre amarela 17DD atenuado. Soros coletados individualmente antes da vacinação (-15 DPI aos 4 e 60 DPI foram testados para o total de anticorpos contra o vírus da febre amarela por ELISA, onde valores > 0 UI/mL são considerados positivos. As diferenças entre os dias de contenção foram estabelecidas pelo teste de Friedman (**** $P < 0,0001$).

Os soros dos animais apresentaram respostas discrepantes entre as espécies dos animais na avaliação de desenvolvimento de anticorpos neutralizantes (Figura 5). Todos os indivíduos da espécie *Lagothrix cana* e um *Saguinus imperator* (SI03) não apresentaram títulos em nenhum dos tempos pós vacinação, enquanto o indivíduo *Ateles* sp. (MA01) apresentou título 4 dias pós imunização, mas foi negativo nos outros tempos. Em D60, todos os outros animais das espécies *S. imperator*, *S. xanthosternos*, *A. guariba clamitans*, *P.*

irrorata e *A. infulatus* desenvolveram títulos de anticorpos neutralizantes, sugerindo também soroconversão em comparação com -15 DPI ($P < 0,001$) e com 4 DPI ($P < 0,05$).

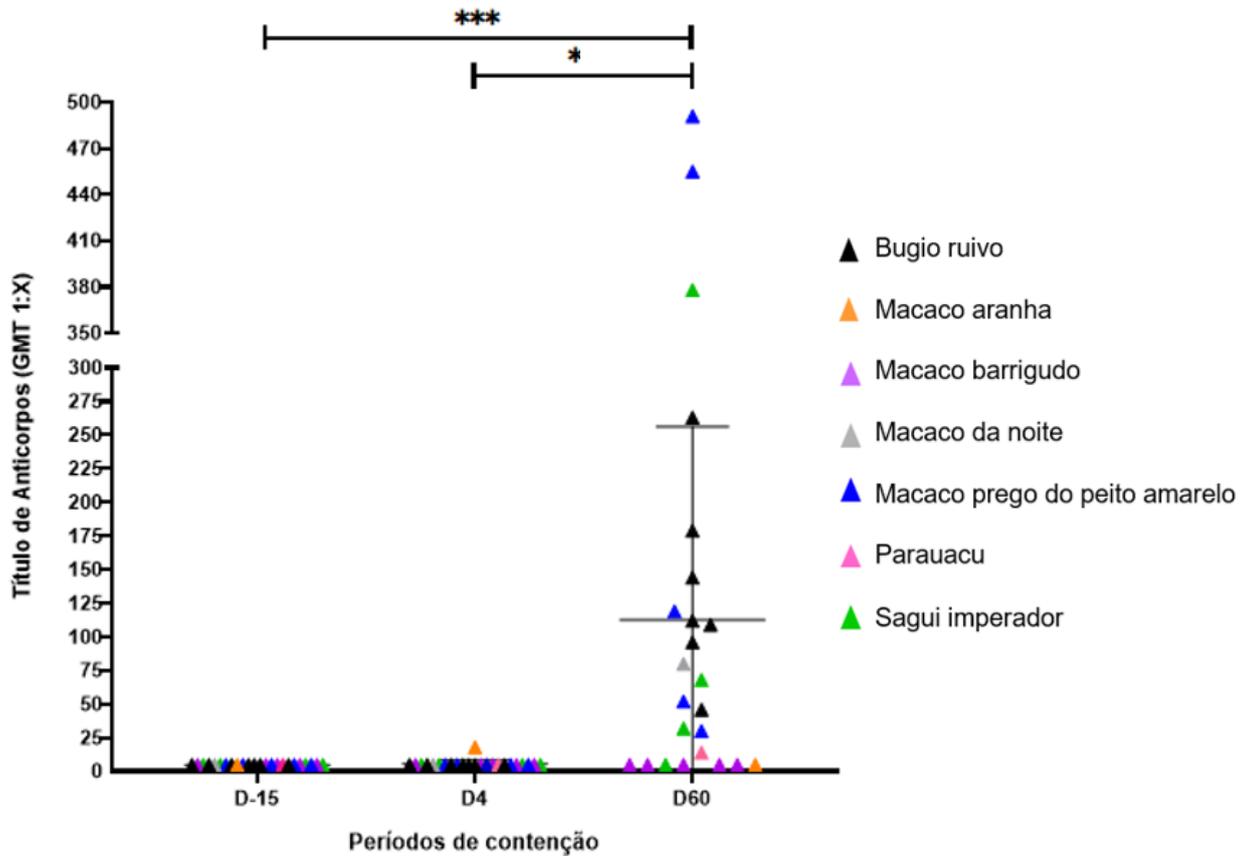


Figura 5. Anticorpos neutralizantes detectados em primatas neotropicais vacinados com VFA 17DD atenuado. Soros coletados antes da vacinação (D-15), aos 4 e 60 dias após a imunização foram testados para atividade neutralizante com diluições séricas individuais associadas a redução na contagem de 50% da infecção viral em placas de controle. As diferenças entre os dias de contenção foram estabelecidas pelo teste de Friedman (***) $P < 0,001$ (*) $P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foram imunizadas diversas espécies de primatas neotropicais, sendo que não há relatos prévios da vacinação de indivíduos das espécies *Saguinus imperator*, *Lagothrix cana*, *Sapajus xanthosternos*, *Pithecia irrorata*, *Aotus infulatus* e *Ateles* sp. Ao utilizar a vacina humana com o vírus 17DD atenuado, buscou-se caracterizar a resposta imunitária e verificar a segurança contra FA por meio de um método acessível para as instituições, bem como com resultados seguros em *Alouatta* sp. em estudos previamente executados (Fernandes *et al.*, 2020).

Os resultados de sorologia e anticorpos neutralizantes demonstram diferenças no padrão de resposta entre as espécies diferentes de primatas neotropicais. Na espécie *S. imperator*, o indivíduo SI03 não apresentou soroconversão em nenhum dos tempos, sugerindo uma falha na inoculação, uma vez que os outros indivíduos (SI01, SI02 e SI04) apresentaram níveis altos de produção tanto de IgG, quanto de anticorpos neutralizantes, mesmo com uma dose e volume menor do que o utilizado nas espécies de maior porte. Assim como o indivíduo SI03, o animal MB04 não apresentou soroconversão também sinalizando falha na inoculação deste animal. Porém, ao contrário dos outros indivíduos *S. imperator*, os animais da espécie *L. cana* não apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes, porém desenvolveram anticorpos IgG anti-FA 60 DPI, sugerindo que a cepa vacinal não é imunogênica para a espécie, uma vez que a resposta de anticorpos neutralizantes é a que efetivamente combate a infecção natural pelo vírus (Santos *et al.*, 2008). Estudo anterior, em que houve a infecção pela cepa Asibi do VFA nos macacos barrigudos, estes animais foram considerados refratários ao vírus e não houve observação de sinais clínicos (Davis, 1930). Somando-se essas informações, é possível que nessa espécie haja diferença de susceptibilidade à doença, bem como uma resposta contra o vírus que não esteja relacionado a produção de anticorpos neutralizantes.

O animal MA01 (*Ateles* sp.) apresentou uma resposta imunológica também diferente, uma vez que teve desenvolvimento de anticorpos neutralizantes em 4 DPI, porém tornando-se negativo em 60 DPI. Assim como a resposta de IgG, que já apresentou titulação em -15 DPI (0,38 UI/mL) e 4 DPI (0,35 UI/mL), os níveis de IgG alcançaram 1,07 UI/mL em 60 DPI, significando então que houve estimulação para produção de anticorpos, porém sem que esses fossem capazes de neutralizar o VFA. Relato anterior de infecção em *Ateles paniscus* por inoculação e por picada de *Aedes aegypti*, foram identificados como sensíveis ao vírus, mas em dois indivíduos não foram visualizados os achados de necrópsias esperados nos outros primatas neotropicais, não sendo visualizada necrose hepática (Davis, 1930). Essas informações somadas, também indicam que não há imunogenicidade nessa espécie, nas características do nosso estudo.

Assim como o macaco-aranha, o animal *P. irrorata* (PA01) também apresentou títulos de IgG em -15 DPI (0,94 UI/mL) e em 4 DPI (0,73 UI/mL) alcançando 1,54 UI/mL em 60 DPI. Já os anticorpos neutralizantes tinham títulos negativos nos tempos iniciais, porém em 60 DPI houve produção (diluição 1:14), indicando assim soroconversão. Este animal apresentou também RNAemia em 4 DPI.

O indivíduo MN01 (*A. infulatus*), apresentou soroconversão, uma vez que teve produção de IgG e também de anticorpos neutralizantes. Assim com todos os indivíduos *S. xanthosternos* e *A. guariba clamitans*. Alguns indivíduos MP01, MP02, MP04, BU01, BU03, BU05, BU06 e BU07 também apresentaram amplificação viral em 4 DPI. Em —15 DPI, os indivíduos BU04, BU05 e BU06 e em D4, BU03, BU04 e BU05 apresentaram títulos baixos de IgG. A avaliação da resposta de anticorpos neutralizantes em macacos rhesus inoculados com doses graduadas da vacina 17D mostraram que a vacina induziu um alto grau de imunogenicidade nesses animais (Mason *et al.*, 1972). Da mesma forma, que a imunização de *Alouatta* spp. vacina humana atenuada provocou a produção de anticorpos neutralizantes contra o VFA (Fernandes *et al.*, 2020), como demonstrado anteriormente por estudos com a cepa 17DD em macacos rhesus (Trindade *et al.*, 2008) e semelhante também ao que acontece nos seres humanos (OMS,2017).

A RNAemia positiva já foi anteriormente relatada em bugios (Fernandes *et al.*, 2020) e em macacos rhesus (Barret, 2020) demonstraram níveis baixos e transitórios entre o 4º e o 7º dia e em 6 DPI, respectivamente, o que é consistente com nossos achados de RNAemia 4 DPI, principalmente por se tratar de um vírus vivo atenuado. Com a variação de resultado entre os animais de uma mesma espécie, sugere-se que além das características de espécie, há também variação de resposta a imunização de indivíduo para indivíduo. Esses resultados também já foram anteriormente descritos em humanos vacinados com a cepa 17D (Reinhardt *et al.*, 1998).

Não era esperado que os animais apresentassem sorologia positiva antes da vacinação, como ocorreu em alguns primatas, porém o ensaio utilizado apresenta reação cruzada com o vírus da dengue, que é também um flavivírus, podendo dessa forma significar um contato prévio com esse agente. Também é importante considerar que estes primatas não humanos são alojados em recintos ao ar livre, expostos a picadas de mosquitos. A possibilidade de ter sido consequência de contato prévio com o VFA é menor, devido ao curso comum da doença ser agudo e altamente letal nos PNH, principalmente nos *Alouatta* sp. (Santos *et al.*, 2020).

Considerando-se a expansão da distribuição geográfica da FA no Brasil e os efeitos sobre as populações de PNH, a busca por iniciativas para protegê-los é extremamente importante. No entanto, vacinar os primatas é uma questão de discussão devido ao seu papel como sentinelas na detecção precoce da circulação do VFA e lançar medidas de controle, como a vacinação da população humana nas áreas afetadas. Porém é importante pensar na vacinação destes animais como medida de contingência para reduzir a circulação viral nas

proximidades de áreas com alto índice demográfico, evitando a participação desses animais como reservatórios do vírus e fonte de infecção para mosquitos, bem como a proteção e preservação de espécies ameaçadas de extinção, que podem ser muito mais relevantes do que o seu papel como sentinelas. A proposta de imunização dos PNH em áreas monitoradas como jardins zoológicos, centros de pesquisa, parques e reservas florestais próximos a áreas urbanas, podem contribuir efetivamente para o controle.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstram um perfil seguro e imunogênico da vacina existente contra FA, que utiliza a cepa 17DD atenuada em bugios ruivos, macacos-prego-do-peito-amarelo, saguis imperadores, macaco da noite e parauacu, entretanto, nas condições empregadas neste estudo, não é imunogênica para os macacos barrigudos e macaco aranha. Este conhecimento pode apoiar estudos adicionais com outras espécies de PNH suscetíveis e fornecer uma possível solução para controlar epizootias e prevenir a devastação de espécies ameaçadas. sendo importante contribuição para a prevenção de surtos epizoóticos e para a conservação de espécies ameaçadas principalmente *ex situ*.

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. A. B. *Yellow Fever*. In: FUENTES, A. The International Encyclopedia of Primatology. 1 ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, p. 1-2, 2017.
- BACHA, H. A.; JOHANSON, G. H. Yellow fever. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 63, n. 4, p. 291-292, 2017.
- BARRETT, A. D. T. Yellow fever vaccine: the conundrum of 2 doses, one dose, or one-fifth dose to induce and maintain protective immunity. *Journal of Infectious Diseases*, v. 221, p. 1922-1924, 2020.
- BENCHIMOL, J. L. *Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, p. 470, 2001.
- CHAMBERS, T. J.; NICKELLS, M. Neuroadapted yellow fever virus 17D: Genetic and biological characterization of a highly mouse-neurovirulent virus and its infectious molecular clone. *Journal of Virology*, v. 75, n. 22, p. 10912-10922, 2001.
- COSTA, Z. G. A.; ROMANO, A. P. M.; ELKHOURY, A. N. M; FLANNERY, B. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. *Revista Pan-Americana de Saúde*, v. 2, n. 1, p. 11-26, 2011.
- CUNHA, M. S.; COSTA, A. C.; FERNANDES, N. C. C. A. *et al.* Epizootics due to yellow fever virus in São Paulo state, Brazil: viral dissemination to new areas (2016-2017). *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 2019.

DAVIS, N. C. The transmission of yellow fever: experiments with the “woolly monkey” (*Lagothrix lagotricha* Humboldt), the “spider monkey” (*Ateles ater* F. Cuvier), and the “squirrel monkey” (*Saimiri sciureus linnaeus*). *Journal of Experimental Medicine*. 1930, v. 51, n. 5, p. 703-720.

DOMINGO, C.; CHARREL, R. N.; SCHMIDT-CHANASIT, J. *et al.* Yellow fever in the diagnostics laboratory. *Emerging Microbes & Infections*, v. 7, n. 1, 2018. doi: 10.1038/s41426-018-0128-8.

ENGELMANN, F.; JOSSET, L.; GIRKE, T. *et al.* Pathophysiologic and transcriptomic analyses of viscerotropic yellow fever in a rhesus macaque model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 11, e3295, 2014.

FARIA, N. R.; KRAEMER, M. U. G.; HILL, S. C. *et al.* Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*, v. 361, p. 894-899, 2018.

FERNANDES, A. T. S.; GASPAR, L. P.; PEREIRA, R. C. *et al.* Plant-produced YFE-1T subunit vaccine against Yellow Fever induces humoral response in captive golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*). In: International Symposium On Immunobiological, 4., 2019; *Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos*, 2019, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, p. 71, 2019.

FERNANDES, A. T. S.; MOREIRA, S. B.; GASPAR, L. P. *et al.* Safety and immunogenicity of 17DD attenuated yellow fever vaccine in howler monkeys (*Alouatta* spp.). *Journal of Medical Primatology*, v. 50, n. 1, p. 1-10, 2020.

FERNANDES, N.; GUERRA, J. M.; DÍAZ-DELGADO, J. *et al.* Differential Yellow Fever susceptibility in New World nonhuman primates, comparison with humans, and implications for surveillance. *Emerging Infectious Diseases*, v. 27, n. 1, p. 47-56, 2021.

FERREIRA, M. S. *Síndrome da febre hemorrágica de etiologia viral*. In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo Patologia, 9. d. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

FIGUEIREDO, P. O.; SILVA, A. T. S.; OLIVEIRA, J. S. *et al.* Detection and molecular characterization of Yellow Fever Virus, 2017, Brazil. *EcoHealth*, v. 15, p. 864-870, 2018.

FRIERSON, J. G. A vacina contra a febre amarela: uma história. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 83, n. 2, p. 77-85, 2010.

Fiocruz. VACINA FEBRE AMARELA (ATENUADA): Pó liofilizado injetável. Responsável técnico Maria da Luz. Rio de Janeiro - RJ: Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – BIO-MANGUINHOS. Disponível em: https://www.bio.fiocruz.br/en/images/stories/pdfs/bulas/fa/BM_BUL_045_00_V_190702_FA10Nacional.pdf. Acesso em: 22 abr. 2022.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. *Flavivirus* In: Fields Virology. Knipe, D. M. & Howley, P. M. Philadelphia, USA, Wolters Kluwer Health, p. 1153- 1252, 2007.

HAHN, C. S.; DALRYMPLE, J. M.; STRAUSS, J. H. 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, 1987.

HUDSON, N. P. The pathology of experimental yellow fever in the *Macacus rhesus*: I. Gross pathology. *American Journal of Pathology*, v. 4, n. 5, p. 395-405, 1928.

HUDSON, N. P. The pathology of experimental yellow fever in the *Macacus rhesus*: II. Microscopic pathology. *American Journal of Pathology*, v. 4, n. 5, p. 407-418, 1928.

HUDSON, N. P. The pathology of experimental yellow fever in the *Macacus rhesus*: III. Comparison with the pathology of yellow fever in man. *American Journal of Pathology*, v. 4, n. 5, p. 419-429, 1928.

KOHLER, S.; BETHKE, N.; BÖTHE, M. *et al.* The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination: immunity to infection. *European Journal of Immunology*, v. 42, n. 9, p. 2363-2373, 2012.

LANG, J.; ZUCKERMAN, J.; CLARKE, P. *et al.* Comparison of the immunogenicity and safety of two 17D yellow fever vaccines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 60, n. 6, p. 1045-1050, 1999.

LITVOC, M. N.; NOVAES, C. T. G.; LOPES, M. I. B. F. Yellow fever. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 64, n. 2, p. 106-113, 2018.

MANDL, C. W.; HOLZMANN, H.; MEIXNER, T. *et al.* Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutant of a flavivirus. *Journal of Virology*, v. 72, n. 3, p. 2132-2140, 1998.

MASON, R. A.; TAURASO, N. M.; GINN, R. K. *et al.* Yellow fever vaccine. V. Antibody response in monkeys inoculated with graded doses of the 17D vaccine. *Journal of Applied Microbiology*, v. 23, n. 5, p. 908-913, 1972.

MELO, A. B.; SILVA, M. D. A. P.; MAGALHAES, M. C. *et al.* Description of a prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, n.4, p. 739-747, 2011.

MENDES, S.L. Febre amarela: ameaça à saúde pública e tragédia ambiental. *Jornal do Brasil* 24 Março 2018. Disponível em: <http://www.jb.com.br/artigo/noticias/2018/03/24/febre-amarela-ameaca-a-saude-publica-e-tragedia-ambiental/>. Acesso em 22 de dezembro de 2023.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. *Boletim Epidemiológico—SVS—Ministério Da Saúde*, v. 48, n. 28, p. 1–22, 2017.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento do período sazonal da febre amarela Brasil—2017/2018. Brasília: Ministério da Saúde; 2018. Disponível em: <http://portal-arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/16/informe-febre-amarela-9-16jan18.pdf>. Acesso em 22 de abril de 2023.

MONATH, T. P.; BALLINGER, M. E.; MILLER, B. R. *et al.* Detection of yellow fever viral RNA by nucleic acid hybridization and viral antigen by immunocytochemistry in fixed human liver. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 40, n. 6, p. 663-668, 1989.

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. *Lancet Infectious Diseases*, v. 1, n. 1, p. 11-20, 2001.

MONATH, T. P. MCCARTHY, K.; BEDFORD, P. Clinical proof of principle for Chimerivax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine*, v.20, n.7-8, p.1004-1018, 2002.

- MOREIRA-SOTO, A.; TORRES, M. C.; MENDONÇA, M. C. L. *et al.* Evidence for multiple sylvatic transmission cycles during the 2016–2017 yellow fever virus outbreak, Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 24, n. 9, p. 1019. e1-e4, 2018
- MUTEBI, J.; WANG, H.; LI, L. *et al.* Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *Journal of Virology*, v. 75, n. 15, p. 6999-7008, 2001.
- NEVES, P. C. C.; MATOS, D. C. S.; MARCOVISTZ, R.; GALLER, R. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine*, v.27, n. 41, p. 5543-5549, 2009.
- NEVES, P. C. C.; RUDERSDORF, R. A.; GALLER, R. *et al.* CD8⁺ gamma-delta TCR⁺ and CD4⁺ T cells produce IFN- γ at 5–7 days after yellow fever vaccination in Indian rhesus macaques, before the induction of classical antigen-specific T cell responses. *Vaccine*, v. 28, n. 51, p. 8183-8188, 2010.
- NEVES, P. C. C.; SANTOS, J. R.; TUBARÃO, L. N. *et al.* Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptive immune responses. *PLoS One*, v. 8, n. 12, e81953, 2013.
- NICKELLS, M.; CHAMBERS, T. J. Neuroadapted yellow fever virus 17D: Determinant in the envelope protein govern neuroinvasiveness for SCID mice. *Journal of Virology*, v. 77, n. 22, p. 12232-12242, 2003.
- OMS. Diagnóstico laboratorial de infecção pelo vírus da Febre Amarela. Organização Mundial de Saúde, Organização Pan-Americana de saúde, 2017.
- REINHARDT B.; JASPERT R.; NIEDRIG M. *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 Medical Virology.*, v.56, p. 159–167, 1998. doi: 10.1002/(SICI)1096-9071(199810)56:2<159::AID-JMV10>3.0.CO;2-B.
- ROMANO, A. P. M. *Febre Amarela*. In.: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014.
- SACCHETTO, L.; SILVA, N. I. O.; REZENDE, I. M. *et al.* Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017–2018 yellow fever outbreaks in Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 10, e0008658, 2020.
- SANTOS, A. P.; MATOS, D. C. S.; BERTHO, A. L. *et al.* Detection of TH1/TH2 Cytokine Signatures in Yellow Fever 17DD First-Time Vaccinees through ELISpot Assay. *Cytokine*. V. 42, p. 152–155, 2008. doi: 10.1016/j.cyto.2008.02.007.
- SANTOS, D.O.; OLIVEIRA, A.R.; LUCENA, F.P. *et al.* Susceptibility of Neotropical Primates Naturally Infected With Yellow Fever Virus. *Veterinary Pathology*, v. 57, n. 5, p. 1–6, 2020.
- STAPLES, J. E.; MONATH, T. P. Yellow fever: 100 years of discovery. *Journal of the American Medical Association*, v. 300, n. 8, p. 960-962, 2008.
- 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, 1928.

THEILER, M.; SMITH, H. H. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. *Journal of Experimental Medicine*, v. 65, n. 6, p. 767-786, 1937.

Trindade GF, Marchevisky RS, de Fillipis AMB, *et al.* Limited replication of yellow fever 17DD and 17D-Dengue recombinant viruses in rhesus monkeys. *Academia Brasileira de Ciências*, v. 80, n. 2, p. 311-321, 2008.

VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.