

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DURAÇÃO DA IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO CONTRA FEBRE
AMARELA EM ADULTOS**

por

Christiane Costa Pereira

Belo Horizonte
2017

TESE DCS-IRR

C.C.PEREIRA

2017

Christiane Costa Pereira

**DURAÇÃO DA IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO CONTRA FEBRE
AMARELA EM ADULTOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde do Instituto
René Rachou, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Ciências – área
de concentração Biologia Celular e Molecular**

Orientação: Dr. Olindo Assis Martins Filho
Coorientação: Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo
Coorientação: Dra. Ana Carolina Campi Azevedo

Belo Horizonte
2017

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P436d Pereira, Christiane Costa.
2017

Duração da Imunidade Pós-Vacinação Contra
Febre Amarela em Adultos / Christiane Costa Pereira.
– Belo Horizonte, 2017.

XIX, 94 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 90 - 96

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título
de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René
Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e
Molecular.

1. Febre Amarela/imunologia 2. Vacina contra Febre
Amarela/uso terapêutico 3. Imunização/utilização I.
Título. II. Martins Filho, Olindo Assis (Orientação). III.
Azevedo, Ana Carolina Campi (Coorientação). IV.
Araújo, Márcio Sobreira Silva (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.918 54

Christiane Costa Pereira

**DURAÇÃO DA IMUNIDADE PÓS-VACINAÇÃO CONTRA FEBRE
AMARELA EM ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular

Banca examinadora:

Dr. Olindo Assis Martins Filho	(IRR/FIOCRUZ) Presidente
Dr. Edward José de Oliveira	(IRR/FIOCRUZ) Titular
Dra. Érica Alessandra Rocha Alves	(IRR/FIOCRUZ) Titular
Dra. Suzane Pretti Figueiredo	(UFMG) Titular
Dr. Daniel Gonçalves Chave	(Fundação Hemominas) Titular
Dra. Soraya Torres Gaze Jangola	(IRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 05/04/2017

Local de desenvolvimento do projeto: Este projeto foi desenvolvido no Grupo Integrado em Pesquisa de Biomarcadores do Instituto René Rachou/FIOCRUZ.

Colaboradores:

Andréa Teixeira Carvalho, Instituto René Rachou, FIOCRUZ
Jordana G. Coelho dos Reis, Instituto René Rachou, FIOCRUZ
Vanessa Peruhype Magalhães, Instituto René Rachou, FIOCRUZ
Lis R. Antonelli, Instituto René Rachou, FIOCRUZ
Cristina T. Fonseca, Instituto René Rachou, FIOCRUZ
Jordana Fradico, Instituto René Rachou, FIOCRUZ
Marina de Moraes Mourão, Instituto René Rachou, FIOCRUZ
Carlos Eduardo Calzavara, Instituto René Rachou, FIOCRUZ
Jaqueline G. de Oliveira, Instituto René Rachou, FIOCRUZ
Roberto H. Farias, Bio-Manguinhos-FIOCRUZ
Tatiana Noronha, Bio-Manguinhos-FIOCRUZ
Jandira A. Lemos, Secretaria de Estado de Saúde, Governo do Estado de Minas Gerais
Vanessa von Doellinger, Bio-Manguinhos-FIOCRUZ
Marisol Simões, Bio-Manguinhos-FIOCRUZ
Mirian M. de Souza, Bio-Manguinhos-FIOCRUZ
Luiz C. Malaquias, Universidade Federal de Alfenas
Harold R. Persi Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro
Jorge M. Pereira Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro
José A. Martins Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro
Marcos Dornelas-Ribeiro Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro
Maria de L. Maia Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos, FIOCRUZ
Marcos da S. Freire, Bio-Manguinhos-FIOCRUZ
Reinaldo de M. Martins, Bio-Manguinhos-FIOCRUZ
Akira Homma, Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos, FIOCRUZ
Alessandro P.M. Romano, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde
Carla M. Domingues, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde
Pedro L. Tauil, Universidade de Brasília
Pedro F. Vasconcelos, Instituto Evandro Chagas-IEC, Ananindeua, Pará
Maria Rios Center for Biologics Evaluation and Research-CBER (FDA)
Karen Chancey Center for Biologics Evaluation and Research-CBER (FDA)
Iramaya R. Caldas, Diretoria Regional de Brasília-Direb, FIOCRUZ
Luiz A. Camacho, Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ
Laurence Amaral: Universidade Federal de Uberlândia
Matheus Gomes: Universidade Federal de Uberlândia
Anna Yoshida Yamamura: Bio-Manguinhos-FIOCRUZ

Suporte financeiro: FAPEMIG, CNPq, FIOTEC, PDTIS, CAPES e Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS).

“O saber contra a ignorância, a saúde
contra a doença, a vida contra a morte...
Mil reflexos da batalha permanente em
que estamos todos envolvidos...”

Oswaldo Cruz (1872-1917)

Dedico este trabalho aos meus pais, Ário e Célia, que são exemplos de vida, força, coragem e amor.

Aos meus irmãos Lucas e Marcos pelo companheirismo e amizade.

Ao Léo, pelo amor e compreensão nos momentos de ausência e ansiedade.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena!

AGRADECIMENTOS

“À Deus, acima de tudo, por estar sempre presente em minha vida, abençoando e guiando meus passos”.

Ao meu orientador Dr. Olindo por ter me incentivado e me guiado desde o mestrado, por sua disponibilidade, generosidade e ensinamentos transmitidos ao longo destes anos de convivência. Orgulho-me de ser sua aluna!

Ao meu co-orientador Márcio, sempre atencioso e prestativo, obrigada pela orientação, confiança, oportunidade e paciência.

À minha co-orientadora Carol, pelo carinho, amizade, orientação e apoio na realização deste projeto.

À Dra. Andrea, pela colaboração, dedicação e por ter enriquecido este trabalho com suas preciosas observações e conhecimento.

Às Dras. Vanessa e Jordana por me ajudarem em todas as situações difíceis, pelos conselhos e convivência alegre.

Ao grupo de Febre Amarela do laboratório. A realização desse trabalho só foi possível porque vocês trabalharam antes e forneceram todas as ferramentas para que chegássemos até aqui. Essa conquista é nossa!

À Dra. Marina, Dr. Carlos Eduardo, Jorge, Dr. Flávio e Dra. Ana pela utilização dos laboratórios sempre que necessário e por me auxiliarem nos experimentos de “biomol”.

Ao Dr. Edward, sempre prestativo e carinhoso, por permitir a utilização do laboratório e do “Step-one”.

À Plataforma de citometria de fluxo, principalmente as queridas colegas Tiza, Bruna e Lorena.

À todos os colegas do GIPB, principalmente as meninas do apoio técnico, e pesquisadoras Fernanda Fortes, Elaine, Karen e Denise.

Aos diretores do Centro de Pesquisa René Rachou pelo apoio e por terem me possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, e aos professores.

À querida amiga Jordana Fradico que me auxiliou em todas as dúvidas sobre os experimentos de biomol, e Cláudio Caetano pela disponibilidade e convivência.

Às minhas “divas quase doutoras” e Jucélia pela amizade durante todos esses anos, e especialmente por tornarem meus dias mais leves e felizes no René. Vocês merecem todo sucesso do mundo!

Aos meus familiares, em especial Vovó Isabel, Carla, Tia Lourdinha e Tia Bia por sempre torcerem por mim.

Aos amigos da fraternidade Palavra viva. Obrigada pela amizade e convivência alegre e iluminada.

Aos amigos-irmãos Oton, Camila e Ariadna pelo carinho e torcida. Obrigada pela presença insubstituível há tantos anos!

Aos meus irmãos Lucas e Marcos e minha “cunha” Amanda, sempre do meu lado, obrigada por tudo irmãos! Amo muito vocês!

Ao Léo, meu amor, pela paciência, dedicação e apoio constante! Obrigada por sempre me dizer nos momentos em que mais precisei: “Não se preocupe, vai dar tudo certo!”

Aos meus pais, meus maiores orgulhos e minha inspiração, por terem feito tudo que estava ao alcance para me ajudar, por me encaminharem na vida com tanto amor, carinho e valores. Agradeço-os por me ensinarem, me corrigirem, me incentivarem, me acalmarem. Amo pra sempre...

Sou eternamente grata a todas as pessoas que mesmo em sua mais breve passagem ou curta convivência me ofereceram sua contribuição, de qualquer natureza, para a realização deste trabalho.

RESUMO

No Brasil, a Febre Amarela está presente principalmente na região Norte, Centro Oeste, parte do Maranhão, Bahia e Região Sudeste. Estudos recentes do Ministério da Saúde do Brasil (MS) têm demonstrado uma expansão considerável da área de risco de infecção pelo vírus da febre amarela, com consequente ampliação mandatória da área territorial de cobertura vacinal anti-amarela. A suscetibilidade à doença é geral e irrestrita. Não há tratamento específico para a doença e a vacina é a forma mais segura de prevenção. Diante disso, foi realizado um estudo descritivo-analítico de aspectos fenotípicos e funcionais da memória imunológica no contexto da duração da imunidade pós-vacinação contra Febre Amarela em adultos primovacinados. E para tal, foram aplicadas técnicas para identificar um conjunto mínimo de biomarcadores como correlatos de proteção. O Estado de memória das células T circulantes (Naive-N / early efector-eEf / Memória Central-CM / Memória efectora-EM) e células B (Naive-N / Memória-não-clássica-nCM / Memória-Clássica-CM) juntamente com o perfil de citocinas intracitoplasmáticas (TNF/IFN/IL-10/ IL-5) e com o perfil de expressão gênica de citocinas e quimiocinas (CCL2, CXL10, CCL5, CXCL8, IL-6, INFb1, TNF, IL-12, IFN g, IL-5 e IL-10) foram monitorados antes de vacinação NV(day0) e em pontos de tempo distintos após a vacinação primária com a vacina 17DD (PV(day30-45); PV(year1-9) e PV(year10-11)).

A vacinação primária desencadeou no dia 30-45 um aumento de vários biomarcadores relacionados com a memória fenotípica e funcional em comparação com o dia 0 (eEfCD4; EMCD4; CMCD19; EMCD8; IFNCD4; IL-5CD8; TNFCD4; IFNCD8; TNFCD8; IL-5CD19; IL-5CD4) com a maioria deles persistindo em PV(year1-9) e diminuindo consideravelmente 10 anos após a vacinação PV(year10-11), independentemente da idade do indivíduo. A expressão gênica de CCL5, CXCL8, TNF, IL-12, INF e IL-10 apresentou uma diferença significativa nos indivíduos vacinados PV(day30-45) e PV(year1-9) em relação aos indivíduos não vacinados NV(day0) e diminuiu consideravelmente no grupo PV(year10-11).

O tratamento de dados de alta dimensionalidade, a partir de algoritmos abrangentes de biologia de sistemas, definiram EMCD8 e IL-5CD4 como os dois melhores preditores fenotípicos e funcionais de memória, e IFN e IL-10 como os melhores biomarcadores de expressão gênica pós-vacinação com a vacina 17DD. Estes 4 biomarcadores associados ao PRNT foram considerados uma ferramenta útil para monitorar as respostas da vacina anti-amarela e a persistência da memória em populações distintas.

Essas descobertas podem, em última análise, contribuir para rever ou manter as atuais diretrizes nacionais de políticas de imunização que recomendam uma dose de reforço 10 anos após a vacinação primária com a vacina 17DD.

Palavras-chave: Febre Amarela, Vacina anti-amarela, Imunização.

ABSTRACT

In Brazil, Yellow Fever is present mainly in the North, Midwest, part of Maranhão, Bahia and Southeast. Recent studies by the Brazilian Ministry of Health (MS) have shown a considerable expansion of the area of risk of infection by the yellow fever virus, with consequent mandatory extension of the territorial area of yellow fever vaccine coverage. Susceptibility to disease is general and unrestricted. There is no specific treatment for the disease and the vaccine is the safest form of prevention. A descriptive-analytical study of phenotypic and functional aspects of immunological memory was carried out in the context of the duration of post-vaccination immunity against Yellow Fever in primo vaccinated adults. To that end, techniques were applied to identify a minimum set of biomarkers as protection correlates. The memory state of circulating T cells (Naive-N / early effector-eEf / Central Memory-CM / Effector Memory-EM) and B cells (Naive-N / Memory-non-classical-nCM / classical Memory -CM) Together with the profile of intracytoplasmic cytokines (TNF/IFN/IL-10/IL-5) and with the gene expression profile of cytokines and chemokines (CCL2, CCL10, CCL5, CXCL8, IL-6, INFb1,TNF,IL-12, IFN g, IL-5 e IL-10) were monitored prior to NV vaccination (day0) and at distinct time points after the primary vaccination with the 17DD vaccine (PV (day30-45); PV (year1-9) and PV (year 10-11)).

Primary vaccination triggered on days 30-45 an increase in several biomarkers related to phenotypic and functional memory compared to day 0 (eEfCD4; EMCD4; CMCD19; EMCD8; IFNCD4; IL-5CD8; TNFCD4; IFNCD8; TNFCD8; IL- 5CD19; IL-5CD4) with most of them persisting in PV (year1-9) and significantly decreasing 10 years after vaccination PV (year10-11), regardless of the individual's age. The expression of CCL5, CXCL8, TNF, IL-12, INF and IL-10 showed a significant difference in the individuals vaccinated PV (day30-45) &PV (year1-9) and decreased considerably in the group PV (year10-11).

The treatment of high dimensional data, from comprehensive system biology algorithms, defined EMCD8 and IL-5CD4 as the two best phenotypic and functional memory predictors, and IFN and IL-10 as the best biomarkers of gene expression after vaccination with the 17DD vaccine. These 4 biomarkers associated with PRNT were considered a useful tool to monitor yellow fever vaccine responses and persistence of memory in distinct populations.

These findings may ultimately contribute to reviewing or maintaining the current national immunization guidelines that recommend a booster dose 10 years after the primary vaccination with the 17DD vaccine.

Key words: Yellow Fever, Yellow fever vaccine, Immunization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Víriões da febre amarela e sua representação esquemática.....	21
Figura 2: Área de Risco da Febre Amarela na América e África.....	22
Figura 3: Distribuição geográfica dos casos suspeitos de febre amarela notificados à SVS/MS até 06 de março de 2017, com início dos sintomas a partir de 01 dezembro de 2016.....	24
Figura 4: Distribuição geográfica das epizootias em primatas não humanos suspeitas de febre amarela notificadas à SVS/MS até 06 de março de 2017, com data de ocorrência a partir de 01 dezembro de 2016.....	25
Figura 5: Distribuição dos municípios segundo a recomendação de vacinação para controle de surto e prevenção da Febre Amarela, Brasil, 2017.....	26
Figura 6: Fluxograma ilustrativo da população de estudo.....	32
Figura 7: Estratégia de análise de linfócitos T e B de memória.....	37
Figura 8: Estratégia de análise de linfócitos T e B produtores de citocinas.....	39
Figura 9: Representação esquemática de uma árvore de decisão.....	45
Figura 10: Análise comparativa da assinatura ascendente de biomarcadores utilizando o resultado obtido pelo grupo 30-45 dias pós-vacinação PV(day30-45) como referência.....	48
Figura 11: Avaliação, do perfil de biomarcadores fenotípicos e funcionais, em linfócitos de adultos primovacinaados após 10-11 anos PV(year10-11) categorizados segundo a idade, após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno da vacina 17DD.....	51

Figura 12: Conjunto de biomarcadores fenotípicos/funcionais importantes para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica (17DD).....	55
Figura 13. Principais biomarcadores fenotípicos/funcionais importantes para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica (17DD).....	59
Figura 14. Alterações nos títulos de anticorpos neutralizantes e biomarcadores relacionados com a memória fenotípica / funcional em momentos distintos após a vacinação primária antiamarílica 17DD.....	62
Figura 15: Determinação do controle endógeno.....	64
Figura 16. Perfil de Expressão Genética em Momentos Distintos após a vacinação primária antiamarílica 17DD em adultos.....	66
Figura 17. Conjunto de biomarcadores de expressão genética relevantes para monitorar a memória após a vacinação primária 17DD.....	69
Figura 18. Análise exploratória de alta dimensão de biomarcadores relevantes para monitorar a memória após a vacinação primária 17DD.....	72
Figura 19: Melhores atributos selecionados através da expressão gênica e PRNT para monitoramento da memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica 17DD.....	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AUC - Área sob a curva
CCL2, CXL10, CCL5, CXCL8 - Quimiocinas
cDNA - DNA complementar
CM CD4 - Linfócito T CD4 de memória central
CM CD8 - Linfócito T CD8 de memória central
CM CD19 - Linfócitos B de memória clássica
Eef CD8 - Linfócito T CD8 *early effector*
EM CD8 - Linfócito T CD8 de memória efetora
Esp - Especificidade
FA - Febre Amarela
FAS - Febre Amarela Silvestre
FAU - Febre Amarela Urbana
IFN- β Interferon beta 1
IFN- γ Interferon Gamma
IL-5 - Interleucina 5
IL-6 Interleucina 6
IL-10 - Interleucina 10
IL-12 Interleucina 12
L B- Linfócitos B
LT CD4- Linfócitos T CD4
LT CD8- Linfócitos T CD8
MEM - Minimal Essential Medium
N CD4 - Linfócito T CD4 *naive*
N CD8 - Linfócito T CD8 *naive*
N CD19 - Linfócitos B *naive*
nCM CD19 - Linfócitos B de memória não clássica
NV(day0) – Grupo de voluntários não vacinados
OMS- Organização Mundial de Saúde
PBMC - células mononucleares do sangue periférico
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PNH- primatas não humanos

PNI- Programa Nacional de Imunizações

PRNT- plaque reduction neutralization test

PV(day30-45) - Grupo de voluntários 30 a 45 dias após a primovacinação com a vacina17DD

PV(year1-9) -Grupo de voluntários 1 a 9 anos após a primovacinação com a vacina17DD

PV(year10-11)- Grupo de voluntários 10 a 11anos após a primovacinação com a vacina17DD

RIN -RNA Integrity Number

ROC -relative operating characteristics curve

RQ - *Relative Quantification*

RT-qPCR - Reação da Transcriptase Reversa, seguida de Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RT-PCR - Reação da Transcriptase Reversa, seguida de Reação em cadeia da polimerase

Sen – Sensibilidade

TNF  fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 População e amostras.....	31
4.2 Titulação de anticorpos neutralizantes (PRNT).....	33
4.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	34
4.4 Macrocultura <i>in vitro</i> antígeno-específica de longa duração.....	34
4.5 Marcação de moléculas de superfície após-estimulação antígeno-específica <i>in vitro</i>	35
4.6 Estratégia de análise de Linfócito T de memória.....	35
4.7 Estratégia de análise de Linfócito B de memória.....	36
4.8 Caracterização funcional da frequência de linfócitos T e B produtores de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras.....	37
4.9 Estratégia de análise de linfócitos T e B produtores de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras.....	38
4.10 Coleta de amostra para biologia molecular.....	39
4.11 Extração de RNA total.....	40
4.12 Verificação da qualidade do RNA extraído.....	40
4.13 Reação de transcrição reversa (RT-PCR).....	40
4.14 Determinação do controle endógeno.....	41
4.15 Detecção dos níveis de expressão gênica por RT-qPCR.....	41
4.16 Análise estatística.....	42

4.17 Outras estratégias de análises empregando ferramentas de biologia de sistemas.....	42
4.17.1 Assinatura ascendente de biomarcadores.....	42
4.17.2 Análise de interseção utilizando Diagrama de Venn.....	43
4.17.3 Análise do perfil de biomarcadores por Pseudo heatmap.....	43
4.17.4 Análise dos dados por árvore de decisão.....	44
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Análise comparativa da Assinatura Ascendente de biomarcadores fenotípicos e funcionais de Linfócitos, utilizando o grupo 30-45 dias pós-vacinação PV(day30-45) como referência, após estímulo in vitro com antígeno da vacina 17DD.....	46
5.2 Avaliação, do perfil de biomarcadores fenotípicos e funcionais, em linfócitos de adultos primovacinados após 10-11 anos, PV (year10-11), categorizados segundo a idade, após estímulo in vitro com antígeno da vacina 17DD.....	50
5.3 Avaliação do conjunto de biomarcadores fenotípicos / funcionais importantes para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica (17DD).....	53
5.4 Seleção dos melhores biomarcadores fenotípicos / funcionais utilizados para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica (17DD).....	57
5.5 Alterações nos títulos de anticorpos neutralizantes e biomarcadores relacionados com a memória fenotípica / funcional em momentos distintos após a vacinação primária antiamarílica 17DD.....	61
5.6 Perfil de Expressão Gênica em momentos distintos após a vacinação primária antiamarílica 17DD em adultos.....	64

5.7 Conjunto de biomarcadores de expressão gênica relevantes para monitorar a memória após a vacinação primária 17DD.....	68
5.8 Análise exploratória de alta dimensão de biomarcadores relevantes para monitorar a memória após a vacinação primária 17DD.....	71
5.9 Melhores atributos selecionados através da expressão gênica e PRNT para monitoramento da memória imunológica após a vacinação primária antiamarilica 17DD.....	74
6 DISCUSSÃO.....	78
7 EVIDÊNCIAS E CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS.....	93
Anexo 1- Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	93
Anexo 2- Artigo Científico Publicado.....	94
Anexo 3- Artigo Científico Submetido.....	107

1 INTRODUÇÃO

A Febre Amarela (FA) é uma doença viral infecciosa aguda, não contagiosa, febril, que se manifesta de forma leve a grave associada à vasculopatia, icterícia, hemorragia, falência hepática, renal e eventualmente morte, que pode ocorrer em até 50% dos casos (1-6). É transmitida exclusivamente, pela picada de um vetor artrópode, por isso sua denominação de arbovirose (7).

O vírus amarelóico é o protótipo do gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae que inclui aproximadamente 70 espécies de vírus. São vírus esféricos, envelopados, com projeções na superfície, medindo de 40-60 nm de diâmetro (8) (Figura 1). Ele é originário da África e compõe-se por RNA de fita simples, não segmentado (9). Apresenta apenas um subtipo com variações genéticas na África e América do Sul. Tais variações não se encontram relacionadas à atividade de doença (9,10). Seu genoma é constituído de 10.862 nucleotídeos, que codificam 3.411 aminoácidos e apresenta uma única região codificante, que é responsável pela formação das inúmeras proteínas virais. Duas regiões não-codificantes são também encontradas e embora não contribuam com formação de proteínas, têm o seu papel na regulação e expressão viral, como replicação, virulência e patogenicidade (8).

O vírus apresenta três proteínas estruturais importantes, as proteínas M, E e C que codificam o precursor da proteína de membrana (M), do envelope (E) e do capsídeo (C) (Figura 1). Pressupõe-se que essas proteínas sejam as possíveis responsáveis pela ativação da resposta imunológica durante a infecção viral. Há outras 7 proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (11) que estão relacionadas com a replicação viral (12). O vírus interage com a célula do hospedeiro por meio de receptores de superfície e é internalizado por endocitose. O pH baixo do endossomo é um fator facilitador para a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Em seguida, ocorre a translação do genoma viral (13).

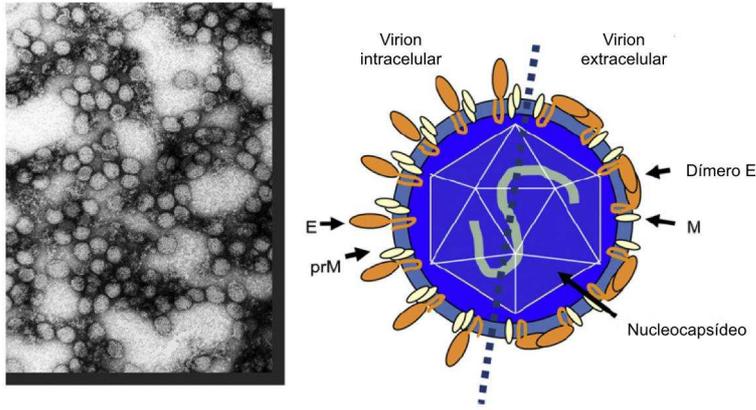


Figura 1: Vírions da febre amarela e sua representação esquemática. Adaptado de Gardner (2010)

São descritos dois ciclos básicos de transmissão do vírus amarelíco pelo vetor, de acordo com a localização geográfica, espécie vetorial e tipo de hospedeiros: Febre Amarela silvestre (FAS) e Febre Amarela urbana (FAU) (14). A Febre Amarela silvestre ocorre em florestas tropicais, onde o vírus é mantido em primatas não humanos que são os principais hospedeiros do vírus amarelíco. Diversos mamíferos, também, são suscetíveis à doença, destacando-se como possíveis reservatórios, os marsupiais e alguns roedores (15). A infecção humana ocorre quando uma pessoa não imunizada penetra no ciclo enzoótico natural por motivos ocupacionais ou de lazer. A maioria das infecções ocorre em homens jovens, em idade laboral, que trabalham na área rural, próximo a regiões de mata e a transmissão é feita por intermédio de mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* na América (14,15) e *Aedes* na África, onde em áreas secas, o vírus também pode ser isolado a partir de carrapatos *Amblyoma variegatum*, indicando eventual papel desses artrópodes na cadeia de transmissão da virose (8,15). O vírus pode, também, ser mantido durante as estações secas através da transmissão vertical nos mosquitos (16,17). A Febre Amarela urbana ocorre quando as pessoas infectadas introduzem o vírus em áreas densamente povoadas, com um elevado número de indivíduos não imunes e mosquitos *Aedes*, favorecendo a transmissão do vírus de pessoa para pessoa. O período de incubação no homem varia de 3 a 6 dias, podendo se estender até 15 dias. A viremia humana dura no máximo 7 dias e vai de 24-48 horas antes do

mais recentemente, em 2008, no Paraguai, em uma área urbana do município de San Lorenzo, cerca 15 km de Assunção (25,26). Na África, ainda ocorrem epidemias de Febre Amarela urbana em regiões contíguas a áreas florestais, onde a Febre Amarela silvestre é enzoótica (8,15).

De tempos em tempos, a Febre Amarela silvestre reemerge no Brasil, produzindo surtos de magnitude e extensão variáveis. Segundo o Ministério da Saúde (2017), estamos passando por um grande surto da doença no qual entre o período de 01 de dezembro de 2016 até 08 de março de 2017, foram notificados 1.431 casos suspeitos de Febre Amarela silvestre, desses, 927 (64,77%) casos permanecem em investigação, 379 (26,50%) casos foram confirmados e 125 (8,73%) foram descartados (Figura 3) (27). A distribuição geográfica dos casos humanos confirmados de Febre Amarela está em expansão e inclui, além do Estado de Minas Gerais, os estados do Espírito Santo e São Paulo. Além disso, o Estado da Bahia relatou 9 casos de Febre Amarela sob investigação, 6 no Estado do Tocantins, um no Rio Grande do Norte e 2 em Goiás (27).

O Estado do Espírito Santo, área que antes não era considerada de risco para Febre Amarela, confirmou 87 casos da doença e no estado de São Paulo, relataram 4 casos confirmados laboratorialmente de Febre Amarela humana. No Estado de Minas Gerais, até o dia 08 de março de 2017, foram notificados 1093 casos (288 confirmados, 748 suspeitos e 57 descartados).

Do total de casos no país, 246 evoluíram para óbito, sendo que 106 (43,10%) óbitos permanecem em investigação, 132 (53,65%) óbitos foram confirmados e 8 foram descartados (3,25%). A taxa de letalidade entre os casos confirmados foi de 34,8% (27).

O perfil demográfico dos casos confirmados coincide com aquele geralmente observado nos surtos de Febre Amarela silvestre, com a maior parte dos casos em pacientes do sexo masculino e idade economicamente ativa, uma vez que esses indivíduos se expõem com maior frequência a áreas e situações de risco, sobretudo em decorrência de atividades laborais. Entre os casos confirmados do Estado de Minas Gerais, 88% são do sexo masculino e 45% não foram vacinados contra a Febre Amarela (o status de vacinação dos 55% restantes é desconhecido ou não disponível) (27).

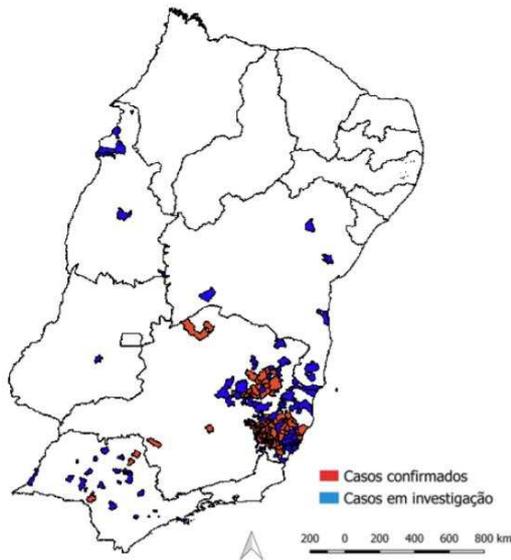


Figura 3: Distribuição geográfica dos casos suspeitos de Febre Amarela notificados à SVS/MS até 08 de março de 2017, com início dos sintomas a partir de 01 dezembro de 2016.

Além disso, até 08 de março de 2017 foram notificadas ao Ministério da Saúde 1228 epizootias em Primatas Não Humanos (PNH), das quais 382 permanecem em investigação, 11 foram descartadas e 386 foram confirmadas para Febre Amarela. (Figura 4)

A reemergência do vírus no Centro-Oeste brasileiro também causou preocupação na época entre 2007 e 2009 após uma expansão da área de circulação viral, quando o vírus atingiu as regiões Sudeste e Sul do país e causou mais de 100 casos da doença, com letalidade de 51%. No período de monitoramento 2014/2015, registrou-se alteração no padrão de ocorrência de casos humanos e epizootias em primatas não humanos (PNH) durante o período sazonal da doença (dezembro/14 a maio/15), com maior incidência de casos humanos em viajantes que realizavam atividades de turismo e lazer. A maior parte dos casos confirmados ocorreu em regiões turísticas de Goiás e Mato Grosso do Sul, áreas que mantêm intenso fluxo de pessoas, sobretudo durante o verão (período sazonal da doença)(28, 29).

Esse caráter dinâmico da epidemiologia da doença tem exigido avaliações periódicas das áreas de risco para melhor direcionamento dos recursos e aplicação das medidas de prevenção e controle (20,29).

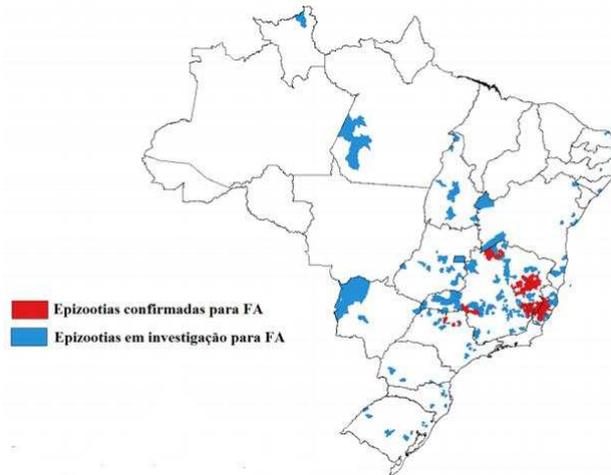


Figura 4: Distribuição geográfica das epizootias em primatas não humanos suspeitas de Febre Amarela notificadas à SVS/MS até 08 de março de 2017, com data de ocorrência a partir de 01 dezembro de 2016.

A principal estratégia de prevenção é a vacinação. A OMS recomenda atualmente duas vacinas antiamarílicas constituídas de vírus vivo e atenuados originárias da amostra 17D, as subamostras 17D-204 e 17DD, consideradas seguras e altamente imunogênicas (30, 31). A vacina correntemente em uso no país é a 17DD e é produzida por Bio-Manguinhos na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Até 2012 todos os países das Américas com as áreas enzoóticas haviam incorporado a vacina nos programas nacionais de imunização, sendo que Argentina, Brasil e Panamá não recomendaram a vacinação em todo território nacional, incorporando-a somente em áreas de risco potencial (32). Porém, em função do surto no Brasil no início deste ano de 2017, o Ministério da Saúde encaminhou, entre os meses de janeiro e fevereiro, para os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro o quantitativo de aproximadamente 11,1 milhões de doses da vacina contra Febre Amarela com objetivo de intensificar as estratégias de vacinação de forma seletiva (Figura 5).

Em julho de 2013, o Grupo Técnico Assessor da OMS realizou a revisão do documento normativo vigente desde 2003 para a vacinação antiamarílica. A revisão enfatizava a necessidade real de dose de reforço a cada 10 anos e a segurança da vacina em indivíduos maiores de 60 anos, pessoas infectadas pelo vírus HIV ou com

outras condições de imunodepressão, mulheres grávidas e nutrízes. Após a revisão, a OMS estabeleceu várias novas recomendações, com destaque para que uma dose única da vacina antiamarílica seja considerada suficiente para proteção por toda a vida. O Regulamento Sanitário Internacional foi alterado então em maio de 2014, estendendo a validade do certificado internacional de vacinação contra Febre Amarela dos atuais 10 anos para toda a vida do vacinado. Esta nova regulamentação foi implementada em junho de 2016 (30,33).

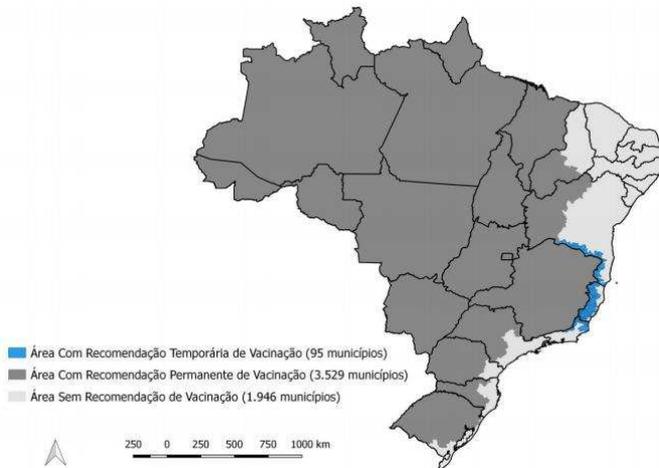


Figura 5: Distribuição dos municípios segundo a recomendação de vacinação para controle de surto e prevenção da Febre Amarela, Brasil, 2017.

O Ministério da Saúde do Brasil analisando as evidências científicas disponíveis sobre a duração da imunidade conferida pela vacina, bem como a situação atual da Febre Amarela no Brasil, e com base no parecer do Comitê Técnico Assessor do Programa Nacional de Imunizações, também estabeleceu novas recomendações sobre a vacina contra Febre Amarela que já estão inseridas nos calendários de vacinação da SBIIm (32-33). Segundo o PNI, crianças de 9 meses até 4 anos de idade devem ser vacinadas com 1dose aos 9 meses de idade e 1 dose de reforço aos 4 anos. Pessoas a partir de 5 anos de idade, que receberam uma dose da vacina antes de completar 5 anos de idade, devem tomar uma única dose de reforço. Pessoas a partir de 5 anos de idade, que nunca foram vacinadas ou sem comprovante de vacinação deve ser administrada a primeira dose da vacina e 1dose de reforço, 10 anos após a

administração dessa dose e pessoas com 60 anos ou mais, que nunca foram vacinadas, deverão ser avaliadas previamente, levando em conta o risco da doença, presença de comorbidades e o risco de eventos adversos nessa faixa etária. É contra indicada a vacinação para gestantes e lactantes de crianças com até 6 meses de idade. (33).

Desde a década de 30, mais de 600 milhões de indivíduos foram vacinados em todo o mundo, entretanto, a ampla área geográfica de circulação viral e expansão de áreas de risco de transmissão contribuem para uma maior demanda de doses. Portanto, para suprir o aumento da demanda por doses, três iniciativas foram propostas pelo Ministério da Saúde: validação de novos lotes-semente, verificação da imunogenicidade de doses mais baixas e investigação da necessidade da revacinação a cada 10 anos. Dentro dessas 3 linhas de investigação, o grupo de pesquisa da Fiocruz-Minas, em parceria com Bio-manguinhos, tem realizado diversos estudos que contribuem com as necessidades do Ministério da Saúde.

Para suprir a primeira demanda, validação de novos lotes semente, o Grupo Colaborativo para Estudos com a Vacina para Febre Amarela (2007) realizou um estudo de imunogenicidade e reatogenicidade entre as cepas 17D-213 e 17DD. Em adultos, a vacina 17DD demonstrou soroconversão e desempenho semelhantes às vacinas produzidas com o lote de sementes da OMS 17D-213/77 (34). Campi-Azevedo e colaboradores (2012) também demonstraram que, assim como a vacina de referência 17DD, o lote de sementes 17D-213/77 induziu um padrão misto de citocinas inflamatórias e reguladoras, apoiando seu uso universal para imunização(35).

Em relação à verificação da imunogenicidade de doses mais baixas, Martins e colaboradores (2013), demonstraram que a redução em até 50 vezes da concentração da vacina para FA 17DD não acarreta comprometimento dos níveis dos títulos de proteção de anticorpos neutralizantes séricos (36). Campi-Azevedo e colaboradores 2014, analisaram biomarcadores séricos IFN- γ e IL-10, em associação com PRNT e viremia e demonstraram que pode-se reduzir em até dez vezes o número de partículas virais/dose da vacina 17DD (37).

E para atender a terceira iniciativa do MS, investigação da necessidade da revacinação a cada 10 anos, foi proposto um estudo duração da imunidade, que demonstrou através da avaliação títulos de anticorpos neutralizantes em adultos vacinados para FA, a necessidade de revacinação após 10 anos da primeira dose. (38)

Embora estes estudos mostrem que o nível de anticorpos neutralizantes possa ser associado com a imunidade protetora (39-40), não há evidências diretas de que anticorpos neutralizantes são os únicos responsáveis pela imunidade. Atualmente, parece haver um consenso que os níveis de anticorpos no soro funcionem como um biomarcador da imunidade protetora, não obstante se a proteção é mediada por células B e células T de memória ou a combinação de ambos os mecanismos. Porém, cabe ressaltar que o estudo de aspectos da imunidade celular na persistência da memória torna-se fundamental, uma vez que essa resposta é a responsável pela produção efetiva dos anticorpos neutralizantes.

Os conhecimentos a cerca da imunidade celular poderão elucidar os aspectos inerentes à memória imunológica na vacinação anti-amarela e responderão questionamentos em relação à persistência de anticorpos neutralizantes e de linfócitos de memória e se existe uma relação entre os títulos de anticorpos neutralizantes e a presença de linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B de memória em adultos submetidos à vacinação contra Febre Amarela.

Considerando o exposto, esse projeto consistiu em avaliar a duração da imunidade pós-vacinação contra Febre Amarela em adultos, por meio da avaliação da resposta imune humoral, celular e análise da expressão gênica de citocinas e quimiocinas em população de adultos primovacinados.

2 JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial da Saúde recomendou, em Junho de 2013, que uma dose única da vacina contra Febre Amarela fosse considerada suficiente para proteção por toda a vida, e o Regulamento Sanitário Internacional foi alterado em maio de 2014, estendendo a validade do certificado internacional de vacinação dos atuais 10 anos para toda a vida do vacinado. Por outro lado, o Ministério da Saúde não concordou com a recomendação da OMS, uma vez que a recomendação de uma dose única foi baseada em poucos estudos científicos, sem base teórica consistente e contemplando amostras pequenas.

Visando ampliar as informações que possam subsidiar a necessidade da revisão do calendário vacinal do Brasil, delineamos um estudo descritivo da resposta imune celular (aspectos fenotípicos e funcionais da memória) com objetivo de avaliar a duração da imunidade pós-vacinação (17DD) contra Febre Amarela em adultos. Essas informações subsidiarão o Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde para avaliação da atual política de revacinação contra Febre Amarela.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

Realizar estudo descritivo-analítico de aspectos fenotípicos e funcionais da memória imunológica no contexto da duração da imunidade pós-vacinação contra Febre Amarela em adultos primovacinados.

3.2 *Objetivos específicos*

1 Estimar e comparar a proporção de soropositividade e a média de reatividade dos títulos séricos de anticorpos neutralizantes contra Febre Amarela em soros de adultos primovacinados, em diferentes tempos de vacinação (artigo publicado-Anexo2);

2 Avaliar o perfil fenotípico/funcional de linfócitos T e B de memória, induzido *in vitro* pelo antígeno amarílico vacinal 17DD em cultura de células mononucleares do sangue periférico de adultos primovacinados, em diferentes tempos de vacinação (artigo publicado-Anexo 2);

3 Identificar biomarcadores fenotípicos e funcionais da memória imunológica celular, induzidos *in vitro* pelo antígeno amarílico vacinal 17DD em cultura de células mononucleares do sangue periférico de adultos primovacinados, em diferentes tempos pós-vacinação, empregando a análise comparativa da assinatura ascendente de biomarcadores de memória (artigo submetido- anexo 3);

4 Selecionar os melhores biomarcadores fenotípicos / funcionais para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica (17DD), empregando ferramentas de biologia de sistemas (artigo submetido -anexo 3);

5 Avaliar o perfil de expressão gênica (citocinas e quimiocinas) induzido *in vitro* pelo antígeno amarílico vacinal 17DD em cultura de células mononucleares de adultos primovacinados em diferentes tempos de vacinação.

6 Selecionar os melhores biomarcadores de expressão gênica para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica (17DD), empregando ferramentas de biologia de sistemas.

4 METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do trabalho, foram utilizadas duas abordagens de estudo. A primeira, descrita no artigo publicado na revista *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, intitulado "Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination" (Anexo 2) na qual foi possível estimar e comparar a proporção de soropositividade, a média geométrica dos títulos séricos de anticorpos neutralizantes contra Febre Amarela em adultos (18-74 anos) primovacinados e avaliar, por caracterização fenotípica/funcional, a frequência de linfócitos T e B de memória, induzida *in vitro* pelo antígeno vacinal 17DD imediatamente antes da primeira vacinação 17DD NV(day0) e em 5 tempos após a primovacinação 17DD: 30 a 45 dias PV(day30-45), 1 a 4 anos PV(year1-4), 5 a 9 anos PV(year5-9), 10 a 11 anos PV(year10-11) e 12 a 13 anos PV(year12- 13). O estudo apresentou caráter longitudinal (grupos NV(day0) e PV(day30-45)) e transversal (demais grupos pós primovacinação).

Na segunda abordagem, foram empregadas novas ferramentas de análise que propõem abordar os dados obtidos de forma a complementar e gerar novos resultados.

Nesse contexto, foram realizadas algumas adequações nos grupos de estudo. Os grupos PV(year1-4) e PV(year5-9) foram unificados, para que o "n" deste novo grupo PV(year1-9) aumentasse e por conseguinte se apresentasse mais adequado para essas novas análises. Optou-se também por retirar o grupo de indivíduos 12-13 anos pós-vacinação PV(year12- 13), visto que houve um aumento sutil na a média geométrica dos títulos séricos de anticorpos neutralizantes desse grupo, sugerindo que alguns destes indivíduos poderiam ter sido revacinados e apresentaram um cartão que não comprovava o registro da revacinação.

4.1 População e amostras

A população de estudo foi composta por voluntários adultos (homens e mulheres), em unidades militares do Exército no Rio de Janeiro, na FIOCRUZ (campus Manguinhos, no Rio de Janeiro) e em unidades de saúde de Alfenas-MG. Este estudo teve aprovação formal do Comitê de Ética para estudos com seres

humanos (CPqRR/FIOCRUZ#24/2010 - Anexo 1). Os voluntários foram classificados como grupo de indivíduos não vacinados NV(day0) ou grupo de primovacinados, que haviam recebido ao longo da vida, uma única dose da vacina antiamarílica 17DD. Estes adultos primovacinados foram categorizados segundo o tempo de pós vacinação: 30-45 dias PV(day30-45); 1-9 anos PV(year1-9) e 10-11 anos PV(year10-11). Vale a pena ressaltar que os grupos não vacinado e primovacinado 30-45 dias foram compostos pelos mesmos indivíduos (Figura 4). O grupo 30-45 dias após primovacinação, PV(day30-45), foi empregado como grupo referência para os estudos imunológicos.

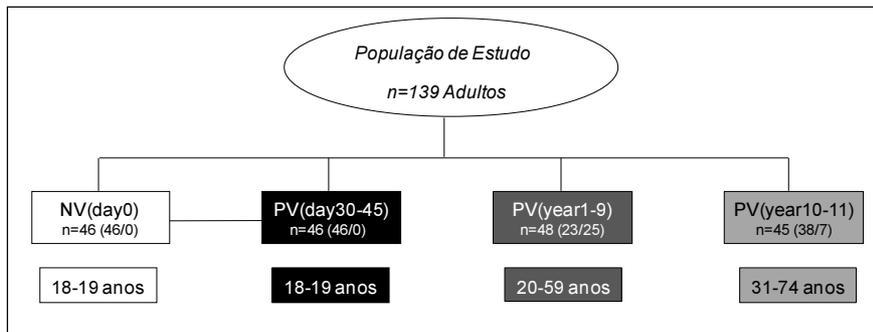


Figura 6: Fluxograma ilustrativo da população de estudo. A população elegível compreende 139 adultos. Os voluntários foram categorizados como grupo de indivíduos não vacinados NV(day0) ou primovacinados segundo o tempo de pós vacinação: 30-45 dias PV(day30-45); 1-9 anos PV(year1-9) e 10-11 anos PV(year10-11). O número de voluntários de cada grupo está representado pela letra “n” e o número de voluntários do sexo masculino/ feminino estão representados respectivamente dentro dos parênteses.

Amostras de 5mL de sangue periférico foram colhidas, na ausência de anticoagulante, de todos os voluntários para a avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes por meio dos testes de neutralização por redução em placa de lise (plaque reduction neutralization test, PRNT) no Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos (LATEV/BIO). Amostras de 20mL de sangue periférico foram colhidas, na presença de anticoagulante heparina sódica, de todos os voluntários para avaliação da duração da imunidade celular (aspectos fenotípicos/funcionais de células T e B de memória) e de expressão gênica de biomarcadores, no Laboratório de

Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz MG.

Para definição de indivíduos soropositivos ou soronegativos, utilizou-se como variável-resposta de interesse o título de anticorpos neutralizantes de soro (em mUI/mL) no grupo 30-45 dias após a primovacinação que foi considerado como Grupo Referência. Desta forma, foram considerados indivíduos soropositivos quando os títulos de anticorpos foram iguais ou maiores que 795 mUI/mL (maior ou igual a $2,9 \text{ Log}_{10}\text{mUI/mL}$); e soronegativo quando os títulos foram menores do que 795 mUI/mL (menor que $2,9 \text{ Log}_{10}\text{mUI/mL}$). A proporção de soropositividade e a média dos títulos de anticorpos foram estimados (com seus respectivos intervalos de 95% de confiança) para cada grupo: NV(day0) e PV(day30-45) (Grupo Referência) e, posteriormente para os demais grupos primovacinados.

4.2 Titulação de anticorpos neutralizantes (PRNT)

O teste padrão-ouro para proteção contra Febre Amarela é o teste de redução de placas por títulos de anticorpos neutralizantes (PRNT) (41,42). O título de anticorpos neutralizantes dos voluntários foi determinado pelo teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀) em monocamadas de células Vero (41). O PRNT é considerado o teste mais sensível e mais específico para Febre Amarela (42), produzindo resultados quantitativos (em Unidades Internacionais) que se correlacionam com proteção. O PRNT₅₀ foi realizado em placas de 96 orifícios, usando diluições seriadas do soro (fator 2), iniciando-se de 1:5 até 1:640, e 30 PFU do vírus 17DD. Um soro padrão proveniente de macaco Rhesus foi utilizado como referência. Esse soro foi previamente calibrado frente a um soro de referência internacional da OMS e a calibração foi repetida a cada dez amostras testadas. A mistura de soro e vírus foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente e, em seguida, uma suspensão de células Vero foi adicionada a essa mistura. Depois de um período de 3 horas de incubação, as células foram cobertas com meio semi-sólido contendo carboximetilcelulose e incubadas por sete dias a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, a monocamada celular foi fixada com formaldeído a 10% e corada com cristal violeta 0,04%. As placas de lise foram contadas utilizando um projetor de diapositivo adaptado e os títulos de anticorpos foram calculados. A diluição onde

ocorreu 50% de redução do número de placas de lise foi estimada através de regressão linear, usando os valores das recíprocas das diluições e os números de placas imediatamente inferior e superior a 50%. O título médio do soro padrão permitiu a determinação das unidades internacionais de proteção contidas em cada amostra (41).

4.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue total heparinizado foi lentamente adicionado a uma solução de histopaque 1077 na proporção de 2:1, em tubos de poliestireno com capacidade para 50mL. Os tubos foram centrifugados a 400 x g durante 40 minutos a 20°C. Ao final da centrifugação, obteve-se o anel de PBMC entre a interface do histopaque e do plasma. As PBMC foram coletadas e transferidas para tubos cônicos, de polipropileno, de 50mL onde foram lavadas 3 vezes por centrifugação a 400x g por 10 minutos a 4°C em meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium). Finalmente, as células foram ressuspensas em RPMI 1640, contadas em contador automatizado (Countess™) e ajustadas para $1,0 \times 10^7$ PBMC/mL. Toda a manipulação, exceto a contagem de células, foi realizada em condições estéreis em capela de fluxo laminar.

4.4 Macro cultura in vitro antígeno-específica de longa duração

A fim de serem quantificadas as frequências dos linfócitos T e B de memória, as frequências de células produtoras de citocinas intracitoplasmáticas pró-inflamatórias e reguladoras, amostras de PBMC foram incubadas na presença do antígeno vacinal de Febre Amarela, segundo o protocolo descrito a seguir: alíquotas de $1,0 \times 10^6$ PBMC foram incubadas em um volume final de 800 μ L, na presença de RPMI-1640 em placas de 48 poços de poliestireno em duas condições experimentais: 1) na presença apenas de meio de cultura (cultura controle) e 2) meio de cultura + antígeno vacinal na concentração de 10^4 partículas virais – 17DD (cultura antígeno-específica). Ensaio de controle positivo foram realizados utilizando células incubadas na presença de meio de cultura + 5 μ g/mL de PHA (cultura com mitógeno – controle positivo). As culturas foram incubadas por 144 horas a 37°C, 5% CO₂ em estufa úmida.

4.5 Marcação de moléculas de superfície após-estimulação antígeno-específica *in vitro*

Após a cultura de 144 horas, as células foram lavadas com tampão salina fosfato estéril (PBS 1X) e então marcadas com 1µL de Violet Fluor Reagent Dye (LIVE/DEAD-Invitrogen), que permite a identificação das células viáveis e exclusão das células mortas na aquisição por citometria e fluxo. Em seguida, as células foram lavadas com tampão salina fosfato suplementado com 0,5% de albumina bovina estéril (PBS-Wash) e incubadas por 30 minutos com anti-moléculas de superfície para identificação de linfócitos T e B, bem como sub populações de células *naive* e de memória. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS-Wash, fixadas com 100µL de solução fixadora (Max FacsFix– MFF) e 100.000 linfócitos foram adquiridos no equipamento Citômetro de Fluxo LSR Fortessa.

4.6 Estratégia de análise de Linfócito T de memória

Empregando o software FlowJo-9.3.2 (TreeStar), no protocolo de identificação de células T de memória, inicialmente todas as células foram selecionadas quanto aos parâmetros FSC-A x FSC-H para identificação dos singletos, seguido pela seleção de células adquiridas em fluxo sem interrupção por meio de gráfico de “Time” x FSC-A e finalmente pelo *gate* de linfócitos totais. A partir desta seleção, os linfócitos totais foram investigados quanto aos parâmetros APC-Cy-7 CD3 x corante “Live-dead” selecionando linfócitos T viáveis. O próximo passo permitiu segregar os linfócitos TCD4⁺ (auxiliares) dos linfócitos TCD8⁺ (citotóxicos), a partir dos linfócitos TCD3⁺ viáveis, por meio da análise dos parâmetros PercP Cy-5.5 CD8 versus FITC CD4, que representam anti-molécula de superfície CD8, marcada com o fluorocromo PercP Cy-5.5 e anti-molécula de superfície CD4, marcada com o fluorocromo FITC, respectivamente. Após a seleção da sub-população de interesse (LT auxiliar ou LT citotóxico), a próxima e última etapa consistiu na investigação de células T *naive* (N), T *early effector* (Eef), T de memória central (CM) e T de memória efetora (EM). Para esta avaliação, foram investigados os parâmetros PE-Cy-7 CD45RO versus PE CD27, que representam anti-molécula de superfície CD45RO, marcada com o fluorocromo PE-Cy-

7 e anti-molécula de superfície CD27, marcada com o fluorocromo PE, respectivamente. Neste sentido, linfócitos T auxiliares *naive* (N CD4) foram caracterizados pelo fenótipo CD4⁺CD27⁺CD45RO⁻, linfócitos T auxiliares *early effector* (Eef CD4) foram caracterizados pelo fenótipo CD4⁺CD27⁻CD45RO⁻, linfócitos T auxiliares de memória central (CM CD4) foram identificados por CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺ e finalmente, os linfócitos T auxiliares de memória efetora (EM CD4) foram caracterizados pelo fenótipo CD4⁺CD27⁻CD45RO⁺. Todas estas etapas também foram empregadas para a identificação da sub-população de LT citotóxicos (CD8) (Figura 7).

4.7 Estratégia de análise de Linfócito B de memória

Empregando o software FlowJo-9.3.2 (TreeStar), no protocolo de identificação de células B de memória, inicialmente todas as células foram selecionadas quanto aos parâmetros FSC-A x FSC-H para identificação dos singletos, seguido pela seleção de células adquiridas em fluxo sem interrupção por meio de gráfico de "Time" x FSC-A e finalmente pelo *gate* de linfócitos totais. A partir desta seleção, os linfócitos totais foram investigados quanto aos parâmetros PercP-Cy5.5 CD19 x corante "Live-dead". Após a seleção da sub-população de linfócito B viável, a próxima e última etapa consistiu na investigação de células B *naive*, B de memória não clássica e B de memória clássica. Para esta avaliação, foram investigados os parâmetros FITC IgD versus PE CD27, que representam imunoglobulina de superfície IgD, marcada com o fluorocromo FITC e anti-molécula de superfície CD27, marcada com o fluorocromo PE, respectivamente. Desta forma, os linfócitos B *naive* (N CD19) foram caracterizados pelo fenótipo CD19⁺CD27⁻IgD⁺, os linfócitos B de memória não clássica (nCM CD19) foram identificados como células CD19⁺IgD⁺CD27⁺ e, finalmente, os linfócitos B de memória clássica (CM CD19) foram caracterizados pelo fenótipo CD19⁺IgD⁻CD27⁺ (Figura 7).

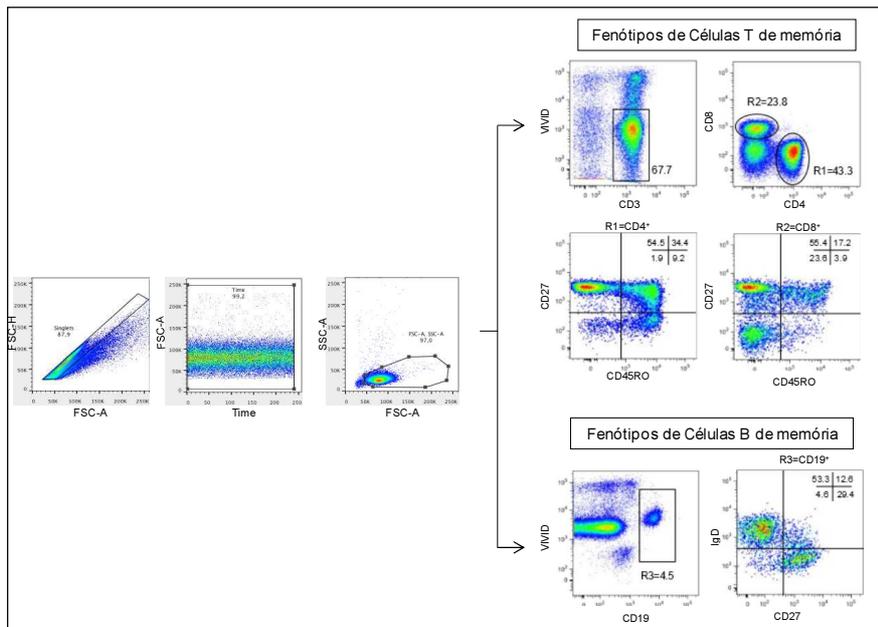


Figura 7: Estratégia de análise de linfócitos T e B de memória.

4.8 Caracterização funcional da frequência de linfócitos T e B produtores de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras

Quatro horas antes do término do período de 144 horas de cultura, adicionou-se 8 μ M de Brefeldina (1mg/mL) e 15 minutos antes do término do período das 144 horas de cultura, adicionou-se 88 μ L de EDTA (20mM), obtendo uma concentração final de 2mM. Após a cultura de 144 horas, as células foram lavadas com tampão salina fosfato estéril (PBS 1X) e então marcadas com 1 μ L de Violet Fluor Reagent Dye (LIVE/DEAD-Invitrogen). Em seguida, as células foram lavadas com tampão salina fosfato suplementado com 0,5% de albumina bovina estéril (PBS-Wash) e incubadas por 30 minutos com anti-moléculas de superfície para identificação de linfócitos T e B. Após a incubação, as células foram fixadas com solução de lise eritrocitária 1x concentrada por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS-Wash. Finalmente, as células foram permeabilizadas tampão salina fosfato suplementado com 0,5% de albumina bovina e 0,5% saponina estéril (PBS-P) e marcadas com anti-moléculas

intracitoplasmáticas (anti-IFN- γ -AlexaFluor 488, anti-IL-5 PE, anti-IL-10 APC e anti-TNF- α PE-Cy7). Após seguidas lavagens com PBS-P e PBS-Wash, as células foram fixadas com 100 μ L de solução fixadora (Max FacsFix-MFF) e 100.000 linfócitos foram adquiridos no equipamento Citômetro de Fluxo LSR Fortessa.

4.9 Estratégia de análise de linfócitos T e B produtores de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras

Empregando o software FlowJo-9.3.2 (TreeStar), no protocolo de identificação de células T e B de produtores de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, inicialmente todas as células foram selecionadas quanto aos parâmetros FSC-A x FSC-H para identificação dos singletos, seguido pela seleção de células adquiridas em fluxo sem interrupção por meio de gráfico de "Time" x FSC-A e finalmente pelo *gate* de linfócitos totais. A partir desta seleção, os linfócitos totais foram investigados quanto aos parâmetros APC-Cy-7 CD3 versus "Live-dead" e PercP-Cy5.5 CD19 x corante "Live-dead", para identificação de linfócitos T e B viáveis, respectivamente. Em seguida, as subpopulações de linfócitos CD4 e CD8 foram identificadas e a partir destas e de linfócitos B, foram identificadas as subpopulações produtoras de citocinas IFN- γ , IL-5, IL-10 e TNF- α (Figura 8).

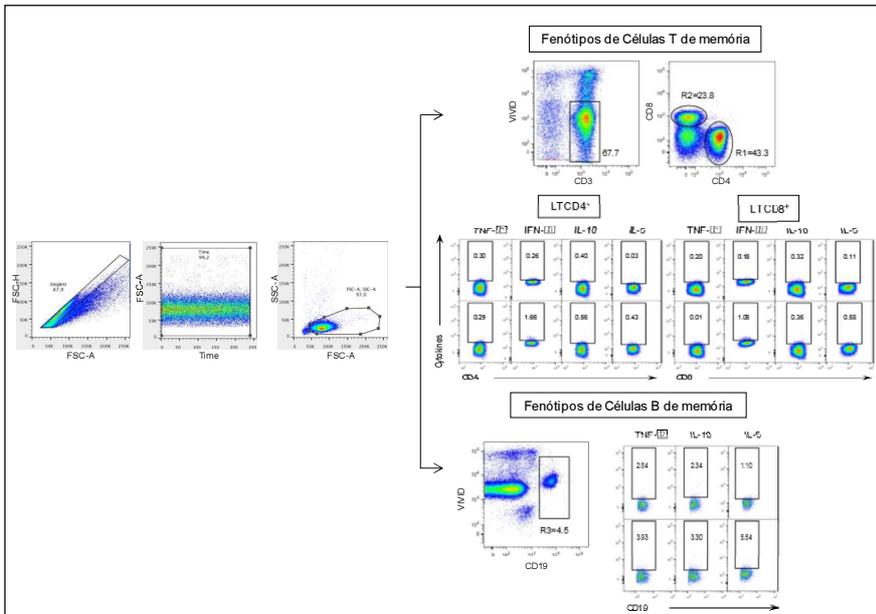


Figura 8: Estratégia de análise de linfócitos T e B produtores de citocinas.

4.10 Coleta de amostra para biologia molecular

Após 144 horas de cultura, as placas de 48 poços foram centrifugadas à 1400 rpm por 10 minutos à 4°C. Foram adicionados 500 μ l de PBS 1X estéril em cada poço, as células foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril e transferidas para microtubos de 1,5 mL. Este material foi centrifugado à 14.500 rpm, por 90 segundos, à 4°C. A placa foi lavada mais uma vez com 500 μ l de PBS 1X estéril por poço e o material foi centrifugado como descrito anteriormente. Após a última centrifugação, todo o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen), então, o material foi homogeneizado ao vórtex e imediatamente armazenado à - 80°C até o momento da extração de RNA total.

4.11 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído com Trizol (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. O RNA extraído foi armazenado à -80°C até o momento da realização da Reação da Transcriptase Reversa (RT-PCR). A quantificação do RNA total foi determinada utilizando o Fluorômetro Qubit (Invitrogen by Life Technologies).

4.12 Verificação da qualidade do RNA extraído

A integridade do RNA (100%) foi analisada utilizando o equipamento BioAnalyzer Agilent 2100 e o kit Agilent RNA 6000 Nano Chips (Agilent). O princípio do BioAnalyzer é o mesmo de uma eletroforese em gel de agarose, porém a corrida é feita em um capilar contendo o polímero e é gerado um eletroferograma, que é analisado automaticamente pelo aparelho, detectando qualquer traço de degradação. O resultado é exibido na forma de um gráfico, através do qual é possível calcular a razão 28S/18S com maior precisão a partir de seus respectivos picos, gerando desta forma o que se denomina RIN (RNA Integrity Number). Os valores de RIN estão numa escala de 1 a 10, sendo que, quanto maior esta pontuação maior é a qualidade e/ou integridade do RNA. De modo geral, para experimentos de PCR quantitativa em tempo real, considera-se um RNA de boa qualidade quando o valor de RIN está acima de 7,5.

4.13 Reação de transcrição reversa (RT-PCR)

O RNA extraído foi submetido a uma transcrição reversa utilizando o Kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) para a síntese do DNA complementar (cDNA) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O cDNA obtido foi armazenado a temperatura de -20°C até o momento da amplificação por RT-qPCR.

4.14 Determinação do controle endógeno

Para determinação do controle endógeno foi realizado o teste com 4 genes constitutivos: BACT, GAPDH, HPRT1 e 18S. A uniformidade de expressão destes genes candidatos foram avaliadas por RT-qPCR em amostras de cDNA. As condições da reação e ciclagem foram: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min no aparelho ABI StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). A análise da uniformidade de expressão do controle endógeno nas amostras foram realizadas por comparação dos resultados de *Relative Quantification* (RQ) e a escolha foi feita pelo candidato com menor desvio padrão de RQ entre as amostras (Figura 15).

4.15 Detecção dos níveis de expressão gênica por RT-qPCR

O cDNA resultante foi utilizado como molde para as reações de RT-qPCR. Para essas reações foi usado o reagente TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e condições de ciclagem universal: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min no aparelho ABI StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). A análise foi realizada pelo software StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Os ensaios para avaliar a expressão gênica nas amostras foram realizados utilizando 5 µL de Master Mix (TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems), 0,5 µL dos iniciadores correspondentes ao grupo de genes do estudo, 0,5 µL do gene constitutivo, 1 µL cDNA padronizado (amostra) e 3,0 µL de água DNA/RNA free, perfazendo um volume de reação final de 10 µL por poço. Os ensaios foram realizados em triplicata para todas as amostras, com o gene constitutivo presente no mesmo poço que os genes avaliados (ensaio duplex). Os resultados foram expressos através do RQ (Relative Quantification) (43) e foram calculados através das seguintes fórmulas:

$$1^{\text{a}} \Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene constitutivo}$$

$$2^{\text{a}} \Delta \Delta Ct = \Delta Ct \text{ Cultura estimulada} - \Delta Ct \text{ da Cultura Controle}$$

$$3^{\text{a}} RQ = (2^{-\Delta \Delta Ct})$$

Foram avaliados a expressão dos seguintes genes: CCL2, CXL10, CCL5, CXCL8, IL-6, INFb1, TNF, IL-12, IFN g, IL-5 e IL-10.

4.16 Análise estatística

A caracterização imunofenotípica de marcadores de linfócitos T e B de memória e células produtoras de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, induzidos *in vitro* pelo antígeno vacinal 17DD foram avaliadas utilizando o 42ay42x, que consiste na razão do percentual de células na cultura estimulada dividido pelo percentual de células na cultura controle (17DD/Controle). Para as análises de expressão gênica, foi utilizado o RQ individual das amostras controle e estimuladas pelo antígeno vacinal. As análises estatísticas entre NV(42ay 0) e PV(42ay 30-45) foram realizadas pelo método Mann-Whitney. As comparações entre PV(42ay 30-45) e os outros grupos pós-vacinados foram realizados utilizando Kruskal-Wallis, seguido de um pós-teste de Dunn. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$). Todas as análises foram feitas utilizando o software Graph Pad Prism 5.0. Para análise de performance dos biomarcadores de proteção foram feitos gráficos de dispersão utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism 5.0 e curvas ROC, utilizando o software MedCalc 16.1.

4.17 Outras estratégias de análises empregando ferramentas de biologia de sistemas

4.17.1 Assinatura ascendente de biomarcadores

Para realizar a análise de assinatura ascendente, utilizou-se o modelo panorâmico de análise fenotípica/funcional. Inicialmente, para determinar o índice (impacto da estimulação antigênica 17DD *in vitro*), foi realizado o cálculo da razão do percentual de células na cultura estimulada dividido pelo percentual de células na cultura controle (17DD/Controle). Em seguida, foi feito um painel panorâmico em que para cada variável (fenótipos, citocinas, quimiocinas) foi calculada a mediana global para segregação de indivíduos em baixo índice e alto índice quando abaixo ou acima da mediana global, respectivamente. O ponto de corte foi determinado considerando

todos os grupos de estudo NV(day0), PV(day 30-45), PV(year 1-9) e PV(year 10-11). Após esta categorização, os indivíduos considerados alto índice para determinada variável, ou seja indivíduos que apresentavam valores acima da mediana global obtido para o biomarcador, foram utilizados para cálculo da frequência de alto índice. Essa frequência então foi colocada em ordem crescente, ou seja, ascendente para seleção dos biomarcadores mais relevantes.

A curva ascendente gerada pelo grupo referência PV(day 30-45), foi sobreposta aos gráficos gerados pelos indivíduos alto produtores (acima da mediana) de cada grupo analisado: NV(day0), PV(year 1-9) e PV(year10-11). No caso da análise de expressão gênica, ao invés de utilizar o índice, foi utilizado o RQ.

4.17.2 Análise de interseção utilizando Diagrama de Venn

O Diagrama de Venn é uma ilustração das relações entre os grupos de objetos em estudo que compartilham algo em comum. Geralmente, estes diagramas são usados para descrever conjunto de interseções (\cap). Para análise de interseção entre os grupos NV(day0), PV(day 30-45), PV(year 1-9) e PV(year10-11) foi utilizado o software Bioinformatics & Evolutionary Genomics, disponível em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Através do software foi possível gerar uma tabela e um gráfico sob a forma de diagrama, indicando quais elementos (biomarcadores fenotípico/funcional e de expressão gênica) estão em interseção entre conjuntos/grupos ou são exclusivos de um determinado conjunto/grupo.

4.17.3 Análise do perfil de biomarcadores por heatmap

Outra ferramenta utilizada para análise do perfil de biomarcadores foi o heatmap, que é uma representação gráfica dos dados, onde os valores individuais contidos na matriz são representados por cores. Para sua construção foi elaborada uma matriz para cada biomarcador selecionado no diagrama de Venn considerando todos os grupos de estudo não vacinados e primovacinados. Foi calculada a mediana global do índice (cultura estimulada 17DD/cultura controle) ou RQ dos indivíduos por biomarcador selecionado e discriminado um valor mínimo e um valor máximo para definição das cores na matriz. Os valores de índice ou RQ acima da mediana global,

próximos à mediana e inferiores a mediana foram representados por diferentes cores respectivamente. Então através dessa codificação de cores foi possível representar a cinética de cada biomarcador nos grupos de estudo NV(day0), PV(day 30-45), PV(year 1-9) e PV(year 10-11).

4.17.4 Análise dos dados por árvore de decisão

A árvore de decisão surge como uma ferramenta auxiliar de análise com o intuito de classificar, gerar regras de associações e “*clusterizar*” os dados. O objetivo é atribuir uma classe a um exemplo (registro), dentre o conjunto de classes pré-definidas, com base nos valores de seus atributos (44).

A estrutura da árvore é organizada hierarquicamente da seguinte forma:

- (a) Raiz - é o atributo que confere a melhor acurácia para a classificação dos conjuntos pré-definidos;
- (b) Nó interno (não-folha) – É o próximo atributo da hierarquia. É rotulado com o nome de um dos atributos previsores;
- (c) Ramos (ou arestas) – Saem da raiz ou de um nó interno. São rotulados com os valores do atributo naquele nó;
- (c) Folha- É rotulada com uma classe, a qual é a classe prevista para exemplos que pertençam àquele nó folha (44)

O algoritmo para a indução das árvores de decisão utiliza a estratégia “dividir para conquistar”, ou seja, um problema complexo é decomposto em subproblemas mais simples. A idéia básica do algoritmo é escolher um atributo; estender a árvore adicionando um ramo para cada valor do atributo; passar os exemplos para as folhas (tendo em conta o valor do atributo escolhido). Deve-se escolher o atributo que tenha o maior poder de discriminação entre as classes para os registros (exemplos) nas folhas. O atributo com maior ganho de informação é utilizado para realizar a primeira separação dos dados (44).

As árvores de decisão foram avaliadas estatisticamente pelos testes de Fisher ou chi-quadrado e para avaliação de performance, foram construídos gráficos de dispersão empregando o software GraphPadPrism5.0., seguidos por curva ROC geradas a partir do software MedCalc 16.1.

A Figura 9 demonstra uma representação esquemática de uma árvore de decisão.

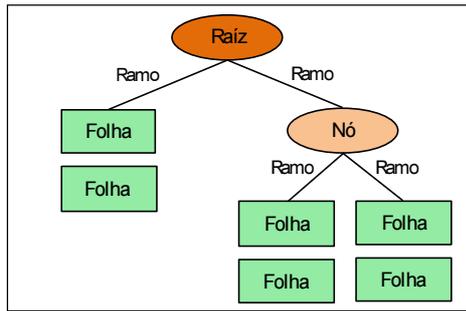


Figura 9: Representação esquemática de uma árvore de decisão. Atributo Raiz e Nó representados por elipses. Os ramos representados por linhas conectoras e folhas representadas por retângulos.

5 RESULTADOS

5.1 Análise comparativa da Assinatura Ascendente de biomarcadores fenotípicos e funcionais de Linfócitos, utilizando o grupo 30-45 dias pós-vacinação PV(day30-45) como referência, após estímulo *in vitro* com antígeno da vacina 17DD

Para análise do perfil de marcadores fenotípicos e funcionais relacionados à memória pós-imunização de indivíduos primovacinados com a vacina antiamarílica, após estímulo *in vitro* com antígeno da vacina 17DD, foi utilizada a estratégia de análise de Assinatura Ascendente de biomarcadores utilizando o grupo PV(day30-45) como referência (Figura 10).

Esta análise foi realizada em todos os grupos de estudo. Os indivíduos que apresentaram baixos índices, ou seja, valores abaixo da mediana global, foram demonstrados na forma de retângulos brancos e os considerados altos índices foram coloridos conforme a cor referente a cada grupo: PV(day 30-45) preto, NV(day0) cinza claro, PV(year 1-9) cinza escuro e PV(year 10-11) cinza médio (Figura 10).

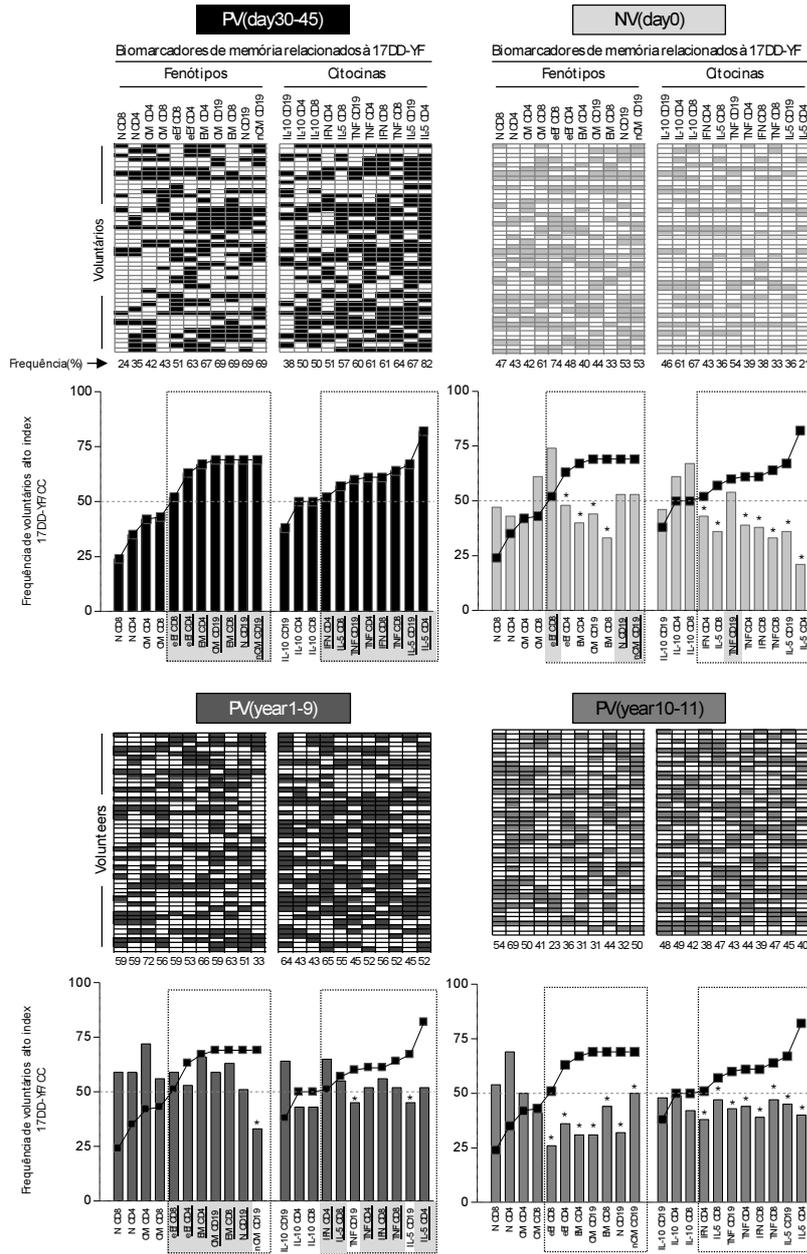
Após esta categorização, os indivíduos que apresentaram altos índices para determinada variável, foram utilizados para cálculo da frequência de indivíduos alto produtores. Esse resultado obtido da frequência foi ordenado de forma crescente, ou seja, ascendente para seleção dos biomarcadores mais relevantes (acima do percentil 50) utilizando um gráfico de barras. Estes biomarcadores importantes foram grifados em destaque no eixo X de cada gráfico.

A curva ascendente gerada pelos resultados obtidos no grupo referência PV(day 30-45), que é o grupo que apresenta o máximo da resposta imunológica pós vacinal, foi utilizada sobreposta aos gráficos gerados pelos grupos de indivíduos alto produtores de cada grupo analisado: NV(day0), PV(year 1-9) e PV(year10-11) para compará-la à estes grupos.

Foram identificados no grupo referência PV(day30-45) 7 biomarcadores fenotípicos classificados como relevantes: eEf CD8, eEf CD4, EM CD4, CM CD19, EM CD8, N CD19 e nCM CD19 e 8 biomarcadores funcionais: IFN CD4, IL-5 CD8, TNF CD19, TNF CD4, IFN CD8, TNF CD8, IL-5 CD19 e IL-5 CD4.

No grupo de indivíduos com 1 a 9 anos após a primovacinação PV(year1-9), quando comparados ao grupo referência PV(day 30-45), todos biomarcadores fenotípicos, com exceção do nCM CD19 continuaram altos. Em relação aos biomarcadores funcionais, IFNCD4, IL-5CD8, TNFCD4, IFNCD8, TNFCD8 e IL-5CD4 também estavam frequentes em mais de 50% dos voluntários considerados altos índice, demonstrando então que a memória imunológica gerada nos indivíduos com 1 a 9 anos após a primovacinação manteve-se persistente.

Já no grupo de indivíduos com 10 a 11 anos após a primovacinação PV(year10-11), observou-se um retorno dos níveis basais das células de memória. Quando comparados ao grupo referência, todos os biomarcadores fenotípicos e funcionais, destacados pelos quadros pontilhados, ficaram abaixo de 50% da frequência de voluntários altos índice, sugerindo então a necessidade de revacinação anti-amarela após 10 anos.



Assimilatura Ascendente de Biomarcadores conforme grupo PV(day30-45)

Figura 10: Análise comparativa da assinatura ascendente de biomarcadores utilizando o resultado obtido pelo grupo 30-45 dias pós-vacinação PV(day30-45) como referência.

O perfil panorâmico de biomarcadores (fenótipos e citocinas) de cada indivíduo, em cada grupo, está demonstrado por diagramas. A mediana global foi o ponto de corte para segregação de indivíduos em baixos index e altos index. Os retângulos brancos representam os indivíduos baixos index, os retângulos pretos e cinzas representam os indivíduos alto index e os retângulos rachurados representam index não calculados. A frequência (%) de indivíduos altos index está representado pelos números abaixo dos diagramas. Os gráficos de barras representam a frequência de indivíduos altos index (eixo Y) por biomarcadores fenotípicos e funcionais relacionados à memória pós vacinação com 17DD (eixo X). A análise comparativa do perfil de biomarcadores entre os grupos PV(day30-45) aos grupos NV(day0), PV(year1-9) e PV(year10-11) foi realizada pela sobreposição das assinaturas ascendentes às barras geradas pelas frequências de cada grupo. A linha pontilhada destaca o percentil 50 da frequência de voluntários altos index. O quadro pontilhado destaca os biomarcadores acima do percentil 50 do grupo PV(day30-45) utilizado como referência para as análises comparativas. O mesmo quadro foi transposto para os gráficos dos demais grupos para facilitar a análise comparativa. Os biomarcadores acima do percentil 50, de todos os grupos, foram grifados em destaque no eixo X de cada gráfico. Os biomarcadores que diminuíram em relação ao grupo referência foram representados por asterisco (*).

5.2 Avaliação do perfil de biomarcadores fenotípicos e funcionais, em linfócitos de adultos primovacinados após 10-11 anos, PV (year10-11), categorizados segundo a idade, após estímulo in vitro com antígeno da vacina 17DD.

Na figura 11, destaca-se o perfil de biomarcadores fenotípicos e funcionais dos linfócitos em 3 subgrupos, categorizados segundo a idade, selecionados a partir do grupo PV(year10-11). Este grupo foi selecionado uma vez que ele se caracteriza pela perda da memória imunológica após 10 anos de vacinação (Figura 11). Essa análise foi realizada a fim de esclarecer se existe algum viés no grupo, uma vez que ele é constituído por indivíduos mais velhos (até 74 anos) e que naturalmente podem perder a memória a diferentes antígenos e não apenas ao antígeno vacinal amarelo 17DD.

O primeiro subgrupo foi composto de adultos jovens de 20-30 anos de idade, o segundo de adultos com idade intermediária de 31-40 anos de idade e o terceiro subgrupo de adultos em idade mais avançada com 41-74 anos de idade.

No primeiro grupo, de adultos de 20-30 anos de idade, dos 15 biomarcadores fenotípicos e funcionais mais relevantes, conforme grupo referência PV(day30-45), 11 ficaram abaixo de 50% da frequência do grupo de voluntários que apresentaram altos índices, ou seja, observou-se um retorno aos níveis basais do número de células de memória.

No segundo grupo, de adultos com idade intermediária de 31-40 anos, a perda de biomarcadores de memória foi ainda mais significativa, pois dos 14 biomarcadores fenotípicos e funcionais relevantes, conforme grupo referência PV(day30-45), 13 ficaram abaixo de 50% da frequência de voluntários com alto índice.

E no último grupo, composto de adultos com idade mais avançada de 41-74 anos, dos 15 biomarcadores fenotípicos e funcionais relevantes, conforme grupo referência PV(day30-45), 11 biomarcadores também ficaram abaixo do percentil 50 da frequência de voluntários alto índice.

Em suma, pode-se observar que há redução de biomarcadores fenotípico/funcionais relacionados com a memória anti-amarela 17DD, quando comparado ao grupo referência PV(day30-45), e esta redução ocorre de forma significativa, independente da idade do voluntário. Reforça ainda que a redução da memória anti-amarela 17DD é um fenômeno associado ao tempo pós-vacinação.

Idade dos voluntários na primo vacinação

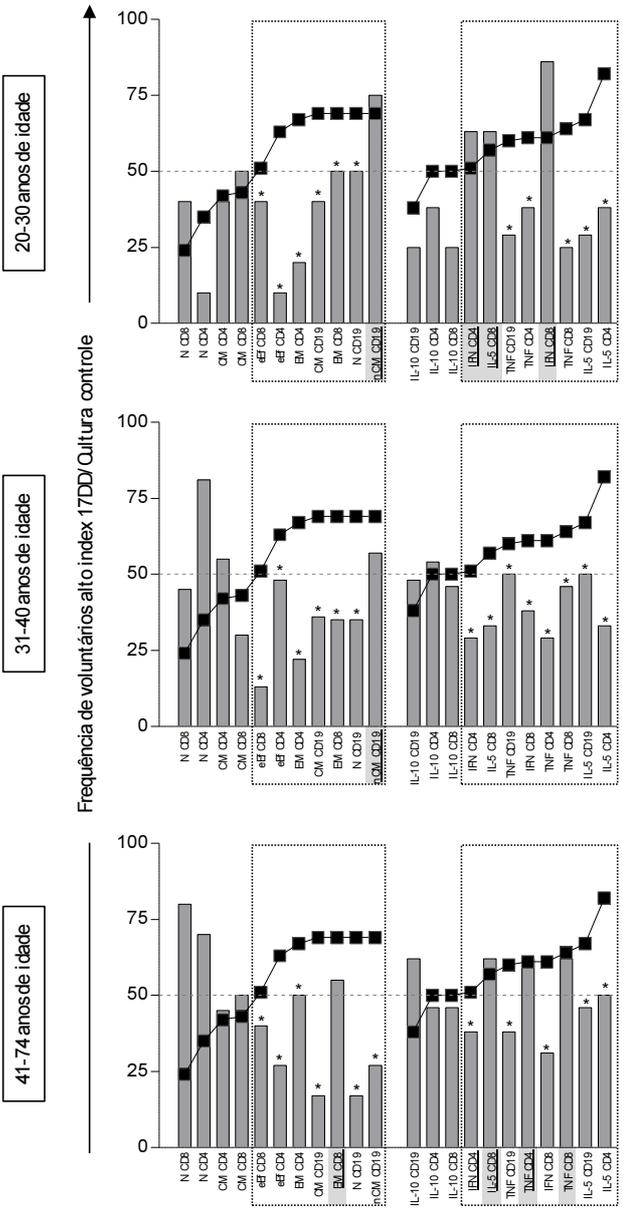


Figura 11: Avaliação, do perfil de biomarcadores fenotípicos e funcionais, em linfócitos de adultos primovacinados após 10-11 anos PV(year10-11) categorizados segundo a idade, após estímulo *in vitro* com antígeno da vacina 17DD. O primeiro gráfico de barras representa o subgrupo de adultos jovens (20-30 anos de idade), o segundo gráfico representa o subgrupo de adultos com idade intermediária (31-40 anos de idade) e o terceiro gráfico representa o subgrupo de adultos em idade mais avançada (41-74 anos de idade). Os respectivos gráficos de barras representam a frequência de indivíduos com altos index (eixo Y) por biomarcadores fenotípicos e funcionais relacionados à memória 10-11 anos pós-vacinação 17DD (eixo X). A análise comparativa do perfil de biomarcadores entre os grupos PV(day30-45) e PV(year10-11) foi realizada pela sobreposição da assinatura ascendente do grupo PV(day30-45) pelos gráficos do subgrupos já descritos. A linha pontilhada destaca o percentil 50 da frequência de voluntários altos index. O quadro pontilhado destaca os biomarcadores acima do percentil 50 do grupo PV(day30-45) utilizado como referência para as análises comparativas. O mesmo quadro foi transposto para os gráficos dos demais grupos para facilitar a análise comparativa. Os biomarcadores acima do percentil 50 foram grifados em destaque no eixo Y de cada gráfico. Os biomarcadores que diminuíram em relação ao grupo referência foram representados por asterisco (*).

5.3 Avaliação do conjunto de biomarcadores fenotípicos / funcionais importantes para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica (17DD)

A fim de melhorar a seleção de biomarcadores relevantes que monitorem a memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica, foi realizada a análise do diagrama de Venn. Essa abordagem complementar foi utilizada para definir, entre os 22 biomarcadores relacionados à memória, aqueles presentes simultaneamente (Interseção entre os grupos) e aqueles biomarcadores únicos para um determinado grupo clínico.

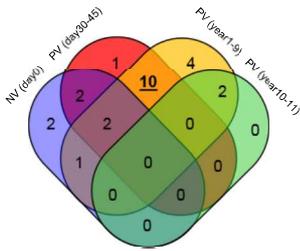
Um diagrama simétrico foi construído para identificar os atributos dentro da interseção entre PV(day30-45) e PV(year1-9), que seriam considerados biomarcadores de proteção (Figura 12). A análise dos dados demonstrou que 10 dos 22 biomarcadores (eEfCD4, EMCD4, CMCD19, EMCD8, IFNCD4, IL-5CD8, TNFCD4, IFNCD8, TNFCD8 e IL-5CD4) estavam comumente presentes em mais de 50% dos voluntários em PV(dia 30-45) & PV(ano1-9) (Figura 12- Diagrama de Venn). A análise de desempenho dos 10 biomarcadores comuns entre os grupos PV(day 30-45) e PV(year1-9) demonstrou que EMCD4, CMCD19, EMCD8 e IL-5CD4 são os biomarcadores mais promissores, porém quando utilizados individualmente, apresentaram baixa precisão global (AUC = 0,7), segundo Swets (1988) (45) (Figura 12 - tabela).

Com o intuito de melhorar a acurácia global dos biomarcadores fenotípicos e funcionais relacionados à memória para discriminar os indivíduos dos grupos PV(day30-45) & PV(year1-9) de NV(day0) & PV(year10-11), os perfis dos biomarcadores selecionados foram avaliados através da análise de heatmap individualmente, bem como o valor médio global (YF-Ag / CC) para os 10 biomarcadores tomados em conjunto (Figura 12 - heatmaps e histogramas). A análise de desempenho do valor médio global demonstrou melhores índices de características operacionais, aumentando a precisão global para moderada (AUC = 0,8), de acordo com Swets (1988) (45), com aumentos concomitantes de sensibilidade (71%) e especificidade (79%) (Figura 12 - diagrama de dispersão e curva ROC).

Os valores médios globais de biomarcadores fenotípicos / funcionais de cada voluntário foram ainda utilizados para calcular o estado de memória resultante juntamente com os títulos de PRNT. Para tanto, foi feita uma placa de memória ("MemoryBoard") para compilar os dados categóricos de P & F (média geral > 1,3) e PRNT (> 2,9mIU / mL) para cada voluntário e posteriormente calcular o estado da memória resultante que chamamos de: Nenhum, presença de P & F, presença de PRNT ou presença simultânea de ambos os atributos de memória (P & F e PRNT) (Figura 3 - diagramas cinza-sombreados). A análise dos dados demonstrou que no grupo NV(day0) há uma proporção predominante (78%) de indivíduos sem atributos de memória (Nenhum), enquanto no PV(day30-45) há uma clara maioria (81%) dos voluntários apresentando ambos atributos de memória. Observou-se também que no PV(year1-9) houve uma prevalência sustentada de voluntários com ambos atributos de memória (55%). No entanto, no grupo PV (year10-11) foi observada uma queda na frequência de voluntários com ambos os atributos de memória (24%). Independentemente da proporção restante de indivíduos com memória PRNT (47%) observada no grupo PV(year10-11), ficou evidente que mais de 20% dos indivíduos vacinados não possuem atributo de memória 10-11 anos após a vacinação primária antiamarílica (Figura 12- gráficos de barras).

Conjunto de biomarcadores fenotípicos/funcionais importantes para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarilica (17DD)

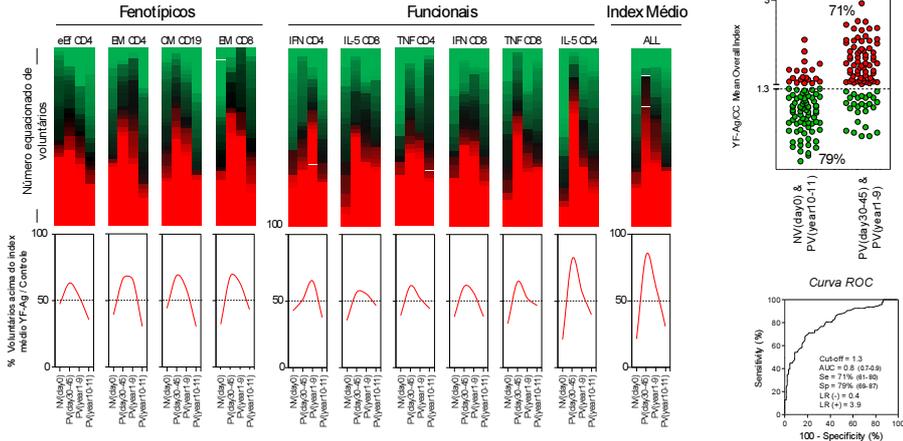
Diagrama de Venn - Seleção de biomarcadores fenotípicos / funcionais



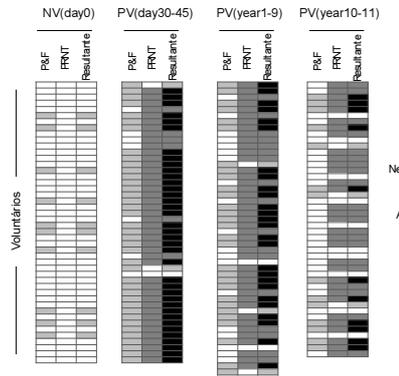
Desempenho de biomarcadores fenotípicos / funcionais comuns em PV(day30-45) & PV(year1-9)

Biomarcador	Cut off	Acurácia Global	Sen.	Esp.
eIF CD4	0.8	0.6 (0.5-0.7)	61 (49-73)	56 (44-67)
EM CD4	1.0	0.7 (0.6-0.8)	78 (67-87)	56 (45-67)
CM CD19	1.0	0.7 (0.6-0.7)	67 (55-77)	61 (50-71)
EM CD8	1.2	0.7 (0.6-0.8)	57 (44-69)	76 (65-84)
IFN CD4	2.1	0.6 (0.6-0.7)	54 (43-65)	70 (58-80)
IL-5 CD8	1.7	0.6 (0.5-0.7)	38 (28-48)	84 (73-91)
TNF CD4	1.1	0.6 (0.5-0.7)	55 (45-66)	63 (51-74)
IFN CD8	1.3	0.6 (0.6-0.7)	68 (58-77)	56 (43-68)
TNF CD8	1.1	0.6 (0.5-0.7)	52 (41-62)	72 (60-82)
IL-5 CD4	1.4	0.7 (0.6-0.8)	69 (58-78)	67 (55-78)

Perfil de biomarcadores fenotípicos / funcionais comuns a PV(day30-45) & PV(year1-9)



Memory Board – Biomarcadores Fenotípicos/Funcionais (P&F) e PRNT



Memória Resultante – 10 Biomarcadores P&F e PRNT

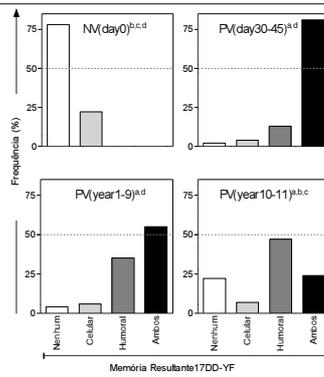


Figura 12. Conjunto de biomarcadores fenotípicos/funcionais importantes para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica (17DD). A análise do diagrama de Venn foi realizada para identificar a interseção de biomarcadores fenotípicos / funcionais (P&F) entre NV(day0) = azul, PV(day30-45) =vermelho, PV(year1-9) = amarelo e PV(year10-11) = verde e selecionar os atributos comuns entre PV(day 30-45) e PV(year1-9), considerados biomarcadores de proteção. Os indicadores de desempenho (cut-off, precisão, sensibilidade-Sen e especificidade-Esp) para os dez biomarcadores comuns selecionados (eEfCD4, EMCD4, CMCD19, EMCD8, IFNCD4, IL-5CD8, TNFCD4, IFNCD8, TNFCD8 e IL-5CD4) estão fornecidos na tabela. A análise de heatmap foi realizada para ilustrar o perfil dos biomarcadores P & F comuns em PV (day30-45) e PV (year1-9).O index médio foi calculado considerando todos os 10 biomarcadores. Os maiores valores de index foram representados pela coloração,vermelha, os valores próximos à mediana global pela cor preta e os menores valores pela cor verde.Histogramas foram construídos para destacar a frequência de voluntários acima do index médio. O gráfico de dispersão foi construído para demonstrar a sensibilidade (Sen) e a especificidade (Esp) do index médio dos 10 biomarcadores P & F, utilizando o limite de corte de 1,3 fornecido pela análise da curva ROC.A placa de memória (Memory board) foi utilizada para determinar o estado da memória resultante para cada indivíduo, considerando o P&F (index médio de 10 biomarcadores > 1,3) e PRNT (>2,9 logmUI / mL). As estatísticas das colunas foram utilizadas para calcular a proporção de indivíduos que exibem status distinto da memória resultante, referida como "nenhum" (□), P&F (▢), PRNT (▣) e ambos(■). A memória resultante para os 10 biomarcadores P&F e PRNT foi exibida em gráficos de barras. As diferenças significativas em $p < 0,05$ (teste Qui-quadrado) da memória resultante foram representadas pelas letras "a", "b", "c" e "d" quando comparados os grupos NV(day0), PV(day30-45), PV(year1-9) e PV(ano10-11) respectivamente.

5.4 Seleção dos melhores biomarcadores fenotípicos / funcionais utilizados para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica (17DD)

Para selecionar os principais biomarcadores, dentre os 22 relacionados à memória imunológica pós primo-vacinação, foi utilizada primeiramente a análise de Árvore de Decisão. Esta abordagem é capaz de selecionar os atributos de raiz fenotípicos e funcionais que apresentam o melhor desempenho (Figura 13).

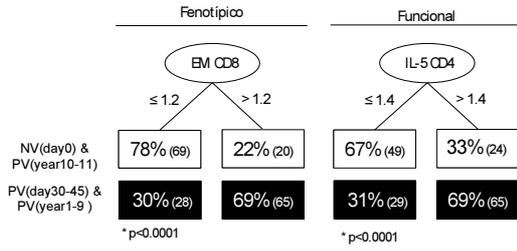
A análise de dados demonstrou que EMCD8 e IL-5CD4 foram os dois melhores atributos fenotípicos e funcionais capazes de segregar os grupos PV(day30-45) & PV(year1- 9) de NV(day0) & PV(year10-11). Utilizando o ponto de corte do index =1,2 para EMCD8 e 1,4 para IL-5CD4 obtivemos uma co-positividade de 69% e 69% [PV (dia 30-45) & PV (ano1-9)] e co-negatividade de 78% e 67%, respectivamente. Além disso, para melhorar as características operacionais desses atributos raiz, foi realizada uma análise combinada do índice médio de EMCD8 & IL-5CD4 utilizando heatmap, gráfico de dispersão e curva ROC (Figura 13 - gráficos de desempenho). Os dados demonstraram que a análise combinada de EMCD8 e IL-5CD4, como biomarcadores fenotípicos / funcionais principais para monitorar a memória imunológica pós vacinação antiamarílica, apresentou desempenho aumentado (AUC = 0,8, Sen = 75%, Esp= 73%) quando comparado à utilização individual de um único atributo (EMCD8 ou IL-5CD4) (Figura 13 - painéis superiores).

Os valores globais do índice médio para EMCD8 & IL-5CD4 foram ainda utilizados para calcular o estado da memória resultante juntamente com os títulos PRNT de cada voluntário. Uma placa de memória ("Memory Board") foi construída utilizando os dados categóricos de EMCD8 e IL-5CD4 (média geral > 1,3) e PRNT (> 2,9mUI / mL) para cada voluntário e calculado o estado da memória resultante (Figura 13 - diagrama sombreado de cinza). Os resultados demonstraram que enquanto o grupo NV(day0) apresentou maior proporção (81%) de indivíduos sem atributos de memória (Nenhum), o grupo PV (day30-45) mostrou predominância (80%) de voluntários com ambos atributos de memória. No PV(year1-9) houve uma prevalência persistente de voluntários com ambos atributos de memória (51%). Por outro lado, no PV (year10-11) observou-se uma diminuição notável na proporção de voluntários com ambos os atributos de memória (29%). Apesar de 42% dos indivíduos ainda

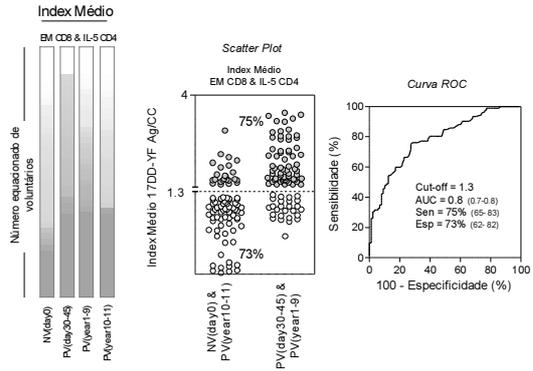
apresentarem a memória PRNT após 10-11 anos da vacinação primária 17DD, é importante salientar que mais de 22% destes vacinados não possuem os dois atributos de memória (biomarcadores P & F e PRNT) (Figura 13 –gráfico de pizza).

Principais biomarcadores fenotípicos/funcionais e PRNT importantes para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária anti-amarela (17DD)

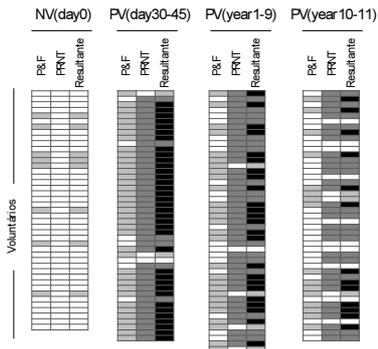
Árvore de Decisão-Seleção de Atributos Raiz para Biomarcadores Fenotípicos/ Funcionais



Desempenho de EM CD8 & IL-5 CD4



Painel de Memória – EM CD8 & IL-5 CD4 (P&F) e PRNT



Memória Resultante – EM CD8 & IL-5 CD4 e PRNT

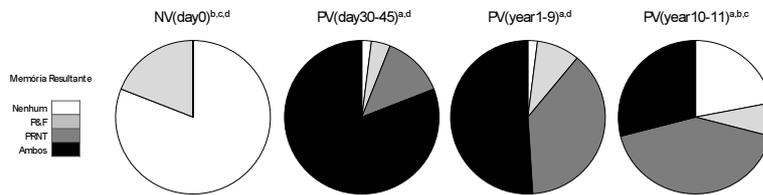


Figura 13. Principais biomarcadores fenotípicos/funcionais importantes para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarilica (17DD). A análise da árvore de decisão foi realizada para identificar os atributos de raiz (○) para biomarcadores fenotípicos / funcionais (P & F) entre os grupos NV(day0) & PV(year10-11) e PV (day30-45) & PV (year1-9). EMCD8 e IL-5CD4 foram selecionados como principais biomarcadores fenotípicos e funcionais relacionados à memória 17DD respectivamente. Para o Heatmap foi utilizado o índice médio dos dois principais biomarcadores P & F (EMCD8 e IL-5CD4). Voluntários que apresentaram índice abaixo do valor médio foram representados pela cor branca (□) e acima do valor médio pela cor (■). O gráfico de dispersão foi construído para demonstrar a sensibilidade (Sen) e a especificidade (Esp) dos dois biomarcadores P & F, empregando o limite de corte (índice médio = 1,3) fornecido pela análise da curva ROC. A placa de memória (Memory board) foi utilizada para determinar o estado da memória resultante para cada indivíduo, considerando o P&F (índice médio dos 2 biomarcadores > 1,3) e PRNT (>2,9 log mUI / mL). As estatísticas das colunas foram utilizadas para calcular a proporção de indivíduos que exibem status distinto da memória resultante, referida como "nenhum" (□), top-2 P&F (□), PRNT (■) e ambos (■). O status de memória resultante dentro de cada categoria, conforme determinado pelos dois biomarcadores P & F e PRNT, foi exibido em gráficos de pizza. As diferenças significativas em $p < 0,05$ (teste Qui-quadrado) da memória resultante foram representadas pelas letras "a", "b", "c" e "d" quando comparados os grupos NV(day0), PV(day30-45), PV(year1-9) e PV(ano10-11) respectivamente.

5.5 Alterações nos títulos de anticorpos neutralizantes e biomarcadores relacionados com a memória fenotípica / funcional em momentos distintos após a vacinação primária antiamarílica 17DD

Para determinar se as alterações nos títulos de PRNT bem como as características relacionadas com a memória de P & F observadas após a vacinação primária 17DD exibem um perfil continuamente decrescente, foi realizada a análise de correlação de Spearman. Os dados foram apresentados como um diagrama de dispersão de valores individuais (Figura 14).

Os resultados demonstraram um padrão dependente do tempo de diminuição nos títulos de anticorpos neutralizantes (PRNT) bem como características fenotípicas / funcionais, com índices mais baixos (YF-Ag / CC) aos 10 anos após a vacinação primária. Os índices de correlação também confirmaram que os dois principais biomarcadores (EMCD8 e IL-5CD4), dos 10 atributos pré-selecionados comuns nos grupos PV (dia 30-45) & PV (ano1-9), juntamente com PRNT, apresentaram maiores Índices de correlação (Figura 14 - fundo cinza).

Alterações nos títulos de anticorpos neutralizantes e biomarcadores relacionados com a memória fenotípica / funcional em momentos distintos após a vacinação primária antiamarilica 17DD

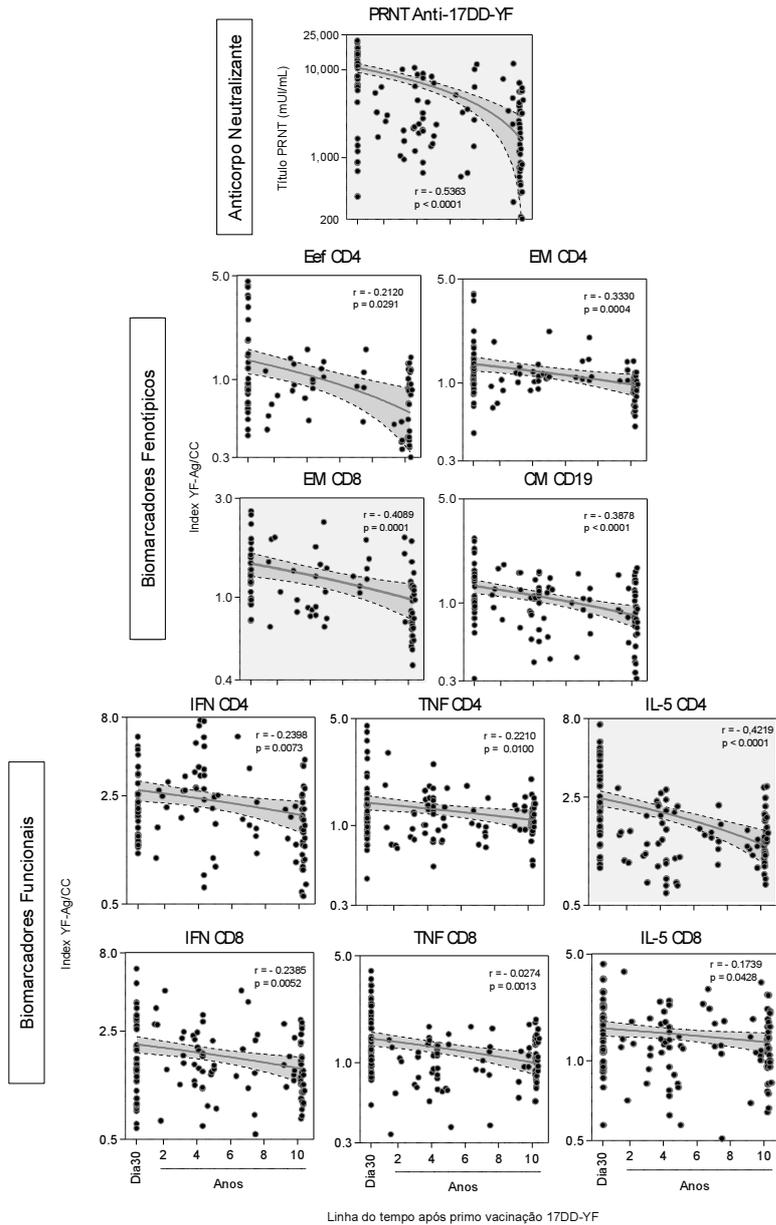


Figura 14. Alterações nos títulos de anticorpos neutralizantes e biomarcadores relacionados com a memória fenotípica / funcional em momentos distintos após a vacinação primária anti-amarela 17DD. As análises de correlação foram realizadas para validar o declínio dependente do tempo nos títulos de anticorpos neutralizantes e características fenotípicas / funcionais relacionadas com a memória 17DD. Os dados foram expressos como distribuição de dispersão de valores individuais ao longo dos diferentes tempos pós vacinação primária 17DD (eixo x) por títulos de anticorpos neutralizantes (PRNT) bem como características fenotípicas e funcionais (Index YF-Ag / CC) (eixo y). O teste de correlação de Spearman foi aplicado para identificar perda significativa relacionada ao tempo de memória relacionada com biomarcadores. Os índices de correlação (p e r) e a faixa de confiança de 95% foram fornecidos na figura. Os atributos com índices de correlação mais altos (valores r) foram destacados com um fundo cinza.

5.6 Perfil de Expressão Gênica em momentos distintos após a vacinação primária anti-amarelônica 17DD em adultos

Antes da avaliação do perfil de expressão gênica em adultos primovacinados em diferentes tempos pós vacinação, foi realizado um teste para determinação do melhor controle endógeno para os ensaios. Foram utilizados 4 genes constitutivos: BACT, GAPDH, HPRT1 e 18S. A análise da uniformidade de expressão do controle endógeno nas amostras foi realizada por comparação dos resultados de Quantificação Relativa (RQ) e a escolha foi feita pelo candidato com menor desvio padrão de RQ entre as amostras (Figura 15).

Entre os candidatos, os genes BACT e GAPDH foram os que apresentaram menor desvio padrão entre os resultados das amostras testadas (Figura 15). Optou-se por utilizar o gene BACT.

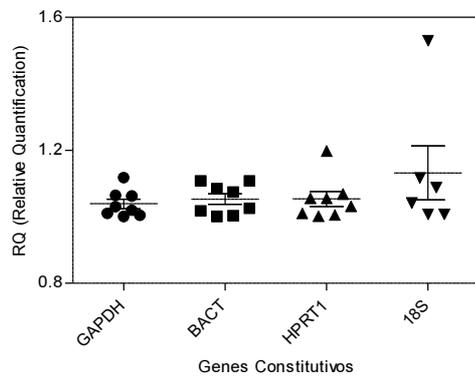


Figura 15: Determinação do controle endógeno. Os dados foram expressos pelos valores de Quantificação Relativa (eixo y) por gene constitutivo (eixo x). O desvio padrão foi representado pela barra horizontal em cada gene testado.

Posteriormente, para determinação do perfil de expressão gênica em adultos primovacinados, os testes foram realizados em duplex (amostra+ ACTB+ Gene alvo) e os resultados foram representados pelos gráficos de barras e assinaturas (Figura 16). Os resultados demonstraram que IFN e IL-10 foram os melhores biomarcadores como correlatos de proteção. A expressão gênica de IFN apresentou um aumento significativo nos indivíduos do grupo PV(day30-45) em relação ao indivíduos não

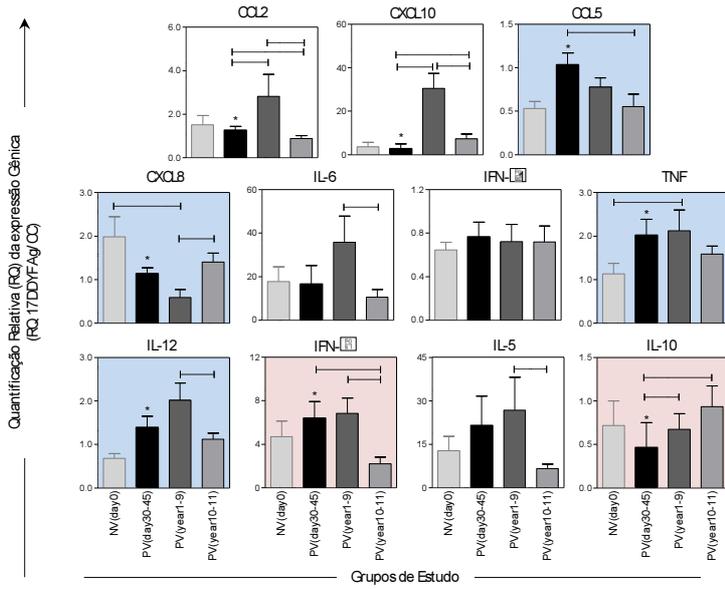
vacinados NV(day0), manteve-se elevado no grupo PV(year1-9) e diminuiu consideravelmente no grupo PV(year10-11) em relação aos grupos vacinados PV(day30-45) e PV(year1-9). Já a expressão de IL-10, apresentou-se com um perfil inverso, houve uma queda significativa desta citocina nos indivíduos do grupo PV(day30-45) em relação ao grupo NV(day0), manteve-se baixo no grupo PV(year1-9) e aumentou significativamente no grupo PV(year10-11) em relação aos grupos PV(day30-45) e PV(year1-9) (Figura 16). Estes biomarcadores foram considerados como os mais promissores para determinação da memória pós primovacinação antiamarilica (gráficos de barras com fundo rosa). Outros biomarcadores foram considerados possíveis candidatos à correlatos de proteção e foram representados pelos gráficos de barras de fundo azul. Foram eles: CCL5, CXCL8, TNF e IL-12.

O perfil panorâmico dos biomarcadores em cada grupo foi demonstrado por gráficos de assinatura (Figura 16). Estes gráficos representam a frequência de indivíduos com expressão gênica (Quantificação Relativa- RQ) superior à Mediana Global por biomarcadores relacionados à memória pós vacinação com 17DD (eixo X). A análise comparativa do perfil de biomarcadores entre os grupos PV(day30-45) aos grupos NV(day0), PV(year1-9) e PV(year10-11) foi realizada pela sobreposição das assinaturas ascendentes às barras geradas pelas frequências de cada grupo. E esta estratégia foi utilizada para selecionar os biomarcadores com mais de 50% de voluntários acima do índice de corte utilizado para análise comparativa entre os grupos.

Um conjunto de seis biomarcadores (IL-10, INF, CCL5, CXCL8, TNF e IL-12) foi predominante nas assinaturas de biomarcadores do grupo PV (dia 30-45) (destacados no eixo X em rosa e azul) (Figura 16). A análise comparativa entre os grupos revelou que NV(day0) apresentou uma deficiência de 4 biomarcadores relacionados com a memória dos 6 citados em PV (day30-45) (CCL5, CXCL8, TNF e IL-12) e um nível de IL-10 superior. Além disso, observou-se que em PV(year1-9), manteve-se semelhante o perfil dos biomarcadores em destaque no PV(day30-45), com exceção do CXCL8 que diminuiu. Por outro lado, observou-se que em PV(year10-11) houve perda de alguns biomarcadores, em destaque IFN, e um aumento significativo de IL-10 quando comparados ao grupo de referência (Figura 16). Esses 2 biomarcadores (IFN e IL-10) foram considerados os "Top-Two" como

Correlatos de Proteção.

Perfil de Expressão Gênica em Momentos Distintos após a vacinação primária antiarabídica 17DD em adultos



Assinatura de Expressão Gênica em Momentos Distintos após a Primovacinação 17DD-YF em Adultos

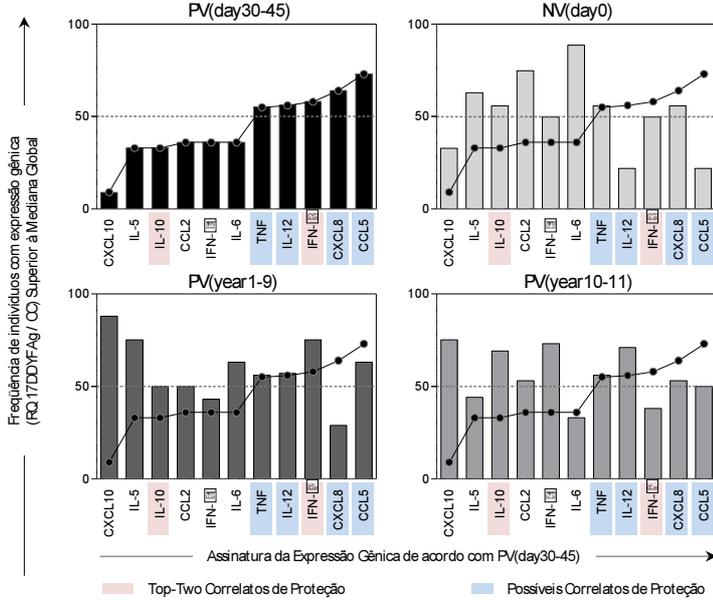


Figura 16. Perfil de Expressão Genética em Momentos Distintos após a vacinação primária anti-amarela 17DD em adultos

O perfil de expressão gênica foi representado pelos gráficos de barras e assinaturas. Os grupos de estudo foram representados pelas cores NV(day0) (□), PV(day30-45) (■), PV(year1-9) (▨) e PV(year10-11) (□). Os biomarcadores considerados possíveis candidatos à correlatos de proteção foram representados pelos gráficos de barras de fundo azul e os biomarcadores considerados os correlatos de proteção mais promissores foram representados pelos gráficos de barras de fundo rosa. As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o grupo NV(day0) e PV(day30-45) e demais grupos de estudo estão representados pelo asterisco (*) e linhas conectoras respectivamente. O perfil panorâmico dos biomarcadores em cada grupo está demonstrado por gráficos de assinatura. Estes gráficos representam a frequência de indivíduos com expressão gênica (Relative Quantification- RQ) superior à Mediana Global (eixo Y) por biomarcadores relacionados à memória pós vacinação com 17DD (eixo X). A análise comparativa do perfil de biomarcadores entre os grupos PV(day30-45) aos grupos NV(day0), PV(year1-9) e PV(year10-11) foi realizada pela sobreposição das assinaturas ascendentes às barras geradas pelas frequências de cada grupo. A linha pontilhada destaca o percentil 50 da frequência de voluntários. Os biomarcadores acima do percentil 50, no grupo referência PV(day30-45), foram coloridos em destaque no eixo X de cada gráfico. Em azul estão representados os possíveis correlatos de proteção e em rosa os melhores (Top-Two) correlatos de proteção.

5.7 Conjunto de biomarcadores de expressão gênica relevantes para monitorar a memória após a vacinação primária 17DD

A fim de melhorar a seleção de biomarcadores relevantes que monitorem a memória imunológica após a vacinação primária antiamarilica, foi realizada a análise do diagrama de Venn posterior aos gráficos de radar (Figura 17). Os gráficos de radar representam a frequência de indivíduos com expressão gênica (RQ) superior à mediana global para avaliar a resposta imunológica antes e em diferentes momentos após a vacinação primária. No grupo referência, PV(day30-45), 5 biomarcadores apresentaram-se acima do percentil 50 (INF, CCL5, CXCL8, TNF e IL-12) e em PV(year1-9) 7 biomarcadores (INF, CCL5, IL-6, TNF, IL-12 e IL-5). Nos grupos NV(day0) e PV(year10-11) houve uma diminuição da área do gráfico radar quando comparados aos grupos PV(day30-45) e PV(year1-9), demonstrando uma queda, com exceção de IL-10, de biomarcadores relevantes para o monitoramento da memória após a vacinação 17DD (Figura 17).

O Diagrama de Venn foi utilizado como uma abordagem complementar para definir, entre os 11 biomarcadores de expressão gênica relacionados à memória, aqueles presentes simultaneamente (Interseção entre os grupos) e aqueles biomarcadores únicos para um determinado grupo clínico. Os resultados demonstraram que INF, CCL5 e TNF eram comuns entre os grupos PV(day30-45) e PV(year1-9); CXCL8 entre NV(day0) e PV(day30-45); IL-12 estava presente nos três grupos de indivíduos vacinados e IL-10 presente em NV(day0) e PV(year10-11) (Figura 17).

Os resultados demonstraram, através dos gráficos de dispersão e curva ROC, que o IFN, CCL5 e IL-10 apresentaram os melhores desempenhos para segregar os indivíduos "não protegidos" NV(day0) & PV(year10-11) dos "protegidos" PV(year30-45) & PV(year1-9).

Conjunto de Biomarcadores de Expressão Gênica Relevantes para Monitorar a Memória após a Vacinação Primária 17DD

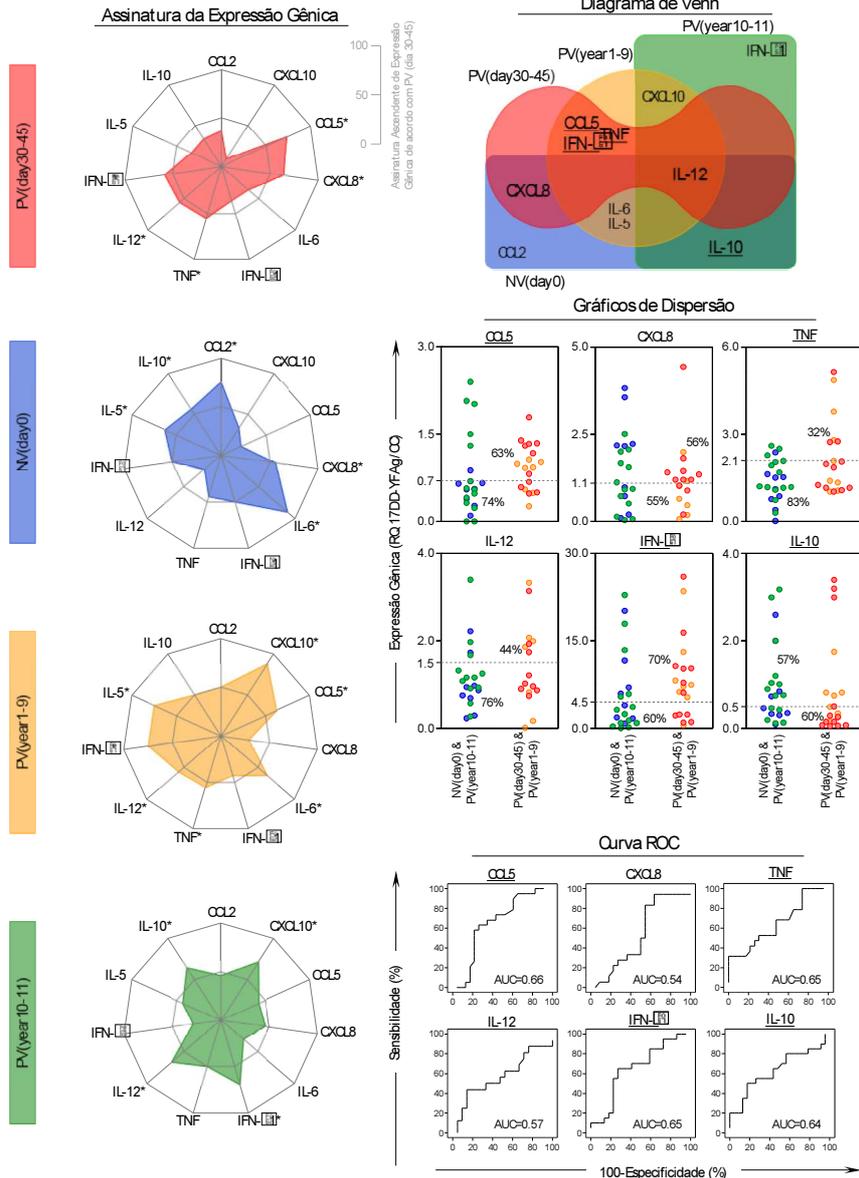


Figura 17. Conjunto de biomarcadores de expressão gênica relevantes para monitorar a memória após a vacinação primária 17DD.

Os gráficos de radar representam a frequência de indivíduos com expressão gênica (Quantificação Relativa- RQ) superior à mediana global para avaliar a resposta imunológica antes e em diferentes momentos após a vacinação primária. O círculo interno representa percentil 50 para cada parâmetro (citocinas e quimiocinas), que foi tomado como limite para definir frequências pertinentes de indivíduos com níveis mais elevados de um determinado biomarcador (*). O diagrama de Venn assimétrico foi construído para selecionar os biomarcadores presentes simultaneamente (Interseção entre os grupos) e aqueles biomarcadores únicos para um determinado grupo clínico, sendo NV(day0) = azul, PV(day30-45) = vermelho, PV(year1-9) = amarelo e PV(year10-11) = verde. Os gráficos de dispersão foram construídos para demonstrar a sensibilidade e a especificidade dos 5 biomarcadores de expressão gênica comuns entre os grupos PV(day30-45), PV(year1-9) e NV(day0) e 1 biomarcador comum entre NV(day0) e PV(year10-11), empregando limites de cortes (RQ médio) individuais. As curva ROC demonstraram a acurácia de cada um dos 6 biomarcadores através da área sob a curva (AUC).

5.8 Análise exploratória de alta dimensão de biomarcadores relevantes para monitorar a memória após a vacinação primária 17DD

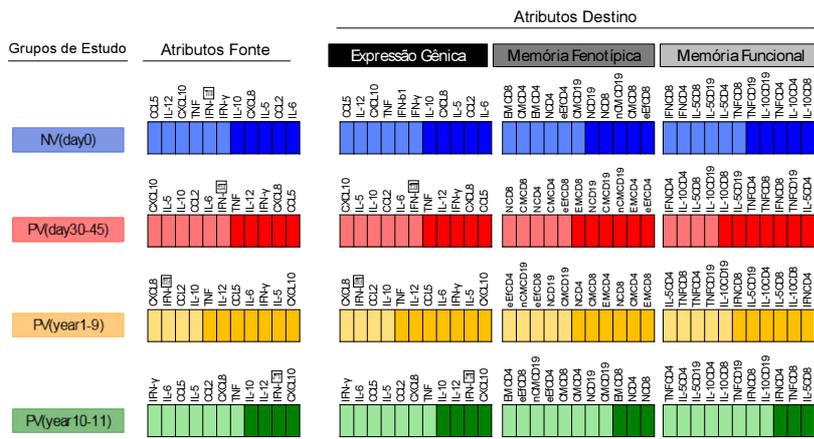
A fim de identificar possíveis correlações entre os biomarcadores de expressão gênica (Atributos Fonte), com os biomarcadores de memória fenotípica, memória funcional e também expressão gênica (Atributos Destino), foi construída uma rede de biomarcadores, utilizando o programa Cytoscape 3.4.0 (Figura 18). Para identificar quais são os biomarcadores contidos nesta rede, foi feito um diagrama demonstrando as assinaturas ascendentes de cada grupo de estudo tanto para os atributos fonte como para os atributos destino.

No diagrama, as cores mais claras representaram os indivíduos com frequência de expressão gênica (Quantificação Relativa- RQ) ou índice (YF-Ag/CC) inferior à mediana global (Baixo Produtores) e as cores mais escuras, os indivíduos com frequência superior à Mediana Global (Alto Produtores). Na rede, as linhas mais largas representaram os indivíduos Alto Produtores e as linhas finas os Baixo produtores. Os Atributos Fonte (biomarcadores de expressão gênica) de cada grupo de estudo foram traçadas na metade esquerda da Rede, enquanto os Atributos destino de expressão gênica, memória fenotípica e funcional foram plotadas na metade direita da rede (Figura 18)

De acordo com os resultados, os indivíduos Alto produtores (atributos fonte) dos grupos PV(day30-35) e PV (year1-9) se correlacionam com maior intensidade com os atributos destino em relação aos grupos NV(day0) e PV(year10-11). Porém essas correlações são detectadas também inespecificamente ao longo de toda a rede, ou seja, é possível observar correlações entre os atributos fonte, independente do grupo de estudo, com vários atributos destino (atributos de memória fenotípica, funcional e de expressão gênica). Diante disso, considera-se que os biomarcadores de expressão gênica são complementares e não substitutivos aos biomarcadores fenotípicos e funcionais para determinação da memória após a vacinação primária antiamarílica.

Análise Exploratória de Alta Dimensão de Biomarcadores Relevantes para Monitorar a Memória Após a Vacinação Primária 17DD

Assinatura Ascendente dos Biomarcadores



Rede de Biomarcadores

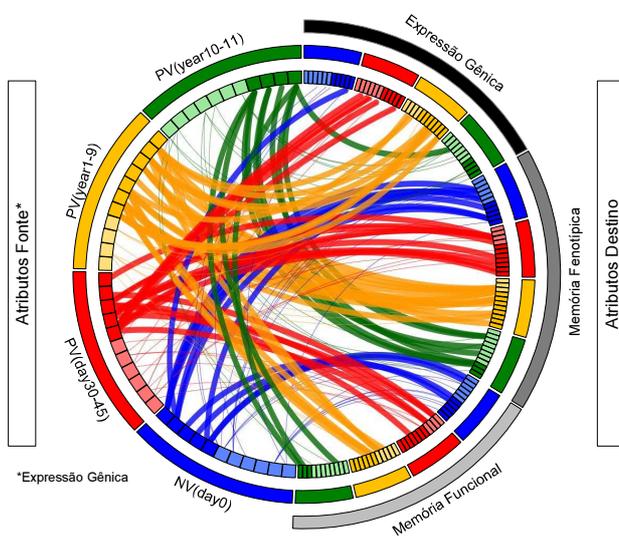


Figura 18. Análise exploratória de alta dimensão de biomarcadores relevantes para monitorar a memória após a vacinação primária 17DD

Assinatura ascendente de cada biomarcador foi demonstrada pelos diagramas, no qual cada grupo de estudo foi representado pelas respectivas cores NV(day0) = azul, PV(day30-45) =vermelho, PV(year1-9) = amarelo e PV(year10-11) =verde. O diagrama foi dividido em duas partes, a primeira relacionada com os “atributos fonte” (expressão gênica) e a segunda com os “atributos destino”(expressão gênica, memória fenotípica e memória funcional). As cores mais claras representam os indivíduos com frequência de expressão gênica (Relative Quantification- RQ) ou índice (YF-Ag/ CC) inferior à Mediana Global e as cores mais escuras, superior à Mediana Global. A rede de biomarcadores representa a correlação entre os “atributos fonte” e os “atributos destino”. Os “atributos fonte” de cada grupo de estudo foram traçadas na metade esquerda, enquanto os “atributos destino” de expressão gênica, memória fenotípica e funcional foram plotadas na metade direita da rede. As linhas conectoras mais finas representam os indivíduos com frequência de expressão gênica (Relative Quantification- RQ) inferior à Mediana Global e as linhas mais largas, superior à Mediana Global.

5.9 Melhores atributos selecionados através da expressão gênica e PRNT para monitoramento da memória imunológica após a vacinação primária anti-amarela 17DD

Para selecionar os principais biomarcadores, dentre os 11 relacionados à memória imunológica pós primo-vacinação, foi utilizada primeiramente a análise de Árvore de Decisão. Esta abordagem é capaz de selecionar os atributos de raiz de expressão gênica que apresentam o melhor desempenho (Figura 19).

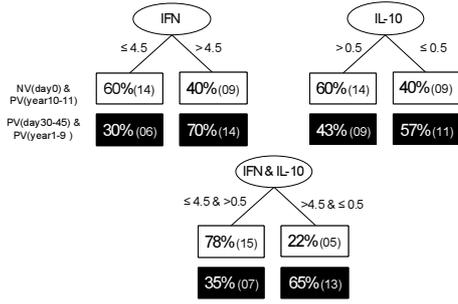
A análise de dados demonstrou que IFN e IL-10 foram os dois melhores atributos de expressão gênica capazes de segregar os grupos PV(day30-45) & PV(year1-9) de NV(day0) & PV(year10-11). Utilizando o ponto de corte do $\text{index} = 4,5$ para IFN e $0,5$ para IL-10 obtivemos uma sensibilidade de 70% e 57% [PV (dia 30-45) & PV (ano1-9)] e especificidade de 60% e 60%, respectivamente. Além disso, para melhorar as características operacionais desses atributos raiz, foi realizada uma análise combinada de IFN & IL-10 utilizando também a análise de Árvore de Decisão e gráfico de dispersão. Os dados demonstraram que a análise combinada de IFN & IL-10, como biomarcadores de expressão gênica principais para monitorar a memória imunológica pós vacinação anti-amarela, apresentou desempenho melhorado ($\text{Sen} = 65\%$, $\text{Esp} = 78\%$) quando comparado à utilização individual de um único atributo (IFN ou IL-10) (Figura 19—Árvore de Decisão e Scatter).

Os valores globais do índice médio para IFN & IL-10 foram ainda utilizados para calcular o estado da memória resultante juntamente com os títulos PRNT de cada voluntário. Uma placa de memória ("Memory Board") foi construída utilizando os dados categóricos de IFN & IL-10 (média geral $>4,5$ & $\leq 0,5$) e PRNT ($> 2,9$ mUI / mL) para cada voluntário e calculado o estado da memória resultante (Figura 19 - diagrama sombreado de cinza). Os resultados demonstraram que enquanto o grupo NV(day0) apresentou maior proporção (78%) de indivíduos sem atributos de memória (Nenhum), o grupo PV (day30-45) mostrou predominância (58%) de voluntários com ambos atributos de memória. No PV(year1-9) houve uma prevalência persistente de voluntários com ambos atributos de memória (63%). Por outro lado, no PV (year10-11) observou-se uma diminuição notável na proporção de voluntários com ambos os atributos de memória (14%). Apesar de 57% dos indivíduos ainda apresentarem a memória PRNT após 10-11 anos da vacinação primária 17DD, é importante salientar

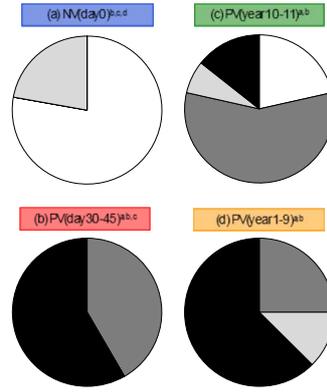
que mais de 22% destes vacinados não possuem os dois atributos de memória (biomarcadores de expressão gênica e PRNT). Quando juntamos os grupos NV(day0)& PV(year10-11) (Grupo Não Protegido) e PV(day30-45)&PV(year1-9) (Grupo Protegido), apenas 8% do Grupo Não Protegido apresentava os dois atributos de memória simultâneos, enquanto que no Grupo Protegido 63% possuíam ambos (Figura 19 –gráfico de pizza).

Melhores Atributos Seleccionados Através da Expressão Gênica e PRNT Para Monitoramento da Memória Imunológica Após a Primo Vacinação Antiamarílica 17DD

Árvore de decisão- Seleção de Biomarcadores de Expressão Gênica



Memória Resultante- IFN & IL-10 e PRNT



Painel de Memória - IFN & IL-10 e PRNT

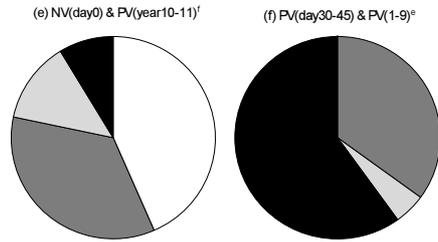
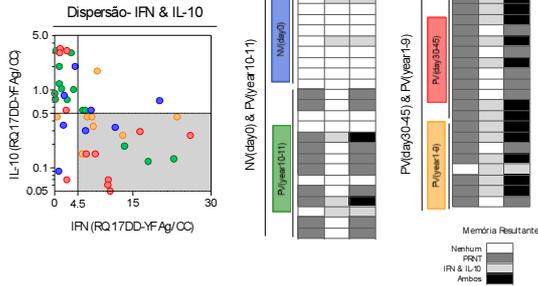


Figura 19: Melhores atributos selecionados através da expressão gênica e PRNT para monitoramento da memória imunológica após a vacinação primária anti-amarela 17DD

As Árvore de decisão representam a categorização dos grupos de estudo “não protegidos” [NV(day0 & PV(year10-11))] e “protegidos” [PV(day30-45 & PV(year10-11))] utilizando como atributo raiz os 2 melhores correlatos de proteção (IFN e IL-10) individualmente e associados. O atributo Raiz foi representado pela elipse. Os pontos de corte, ramos, foram representados pelas linhas conectoras e as folhas, correspondentes aos grupos classificados foram representados pelos retângulos brancos ou pretos.

O gráfico de dispersão foi construído para demonstrar a distribuição dos indivíduos (círculos coloridos) quando utilizado os biomarcadores IFN & IL-10 simultaneamente como correlatos de proteção, com ponto corte $>4,5$ & $\leq 0,5$ (retângulo cinza). A placa de memória (Memory board) foi utilizada para determinar o estado da memória resultante para cada indivíduo, considerando o PRNT ($>2,9$ logmUI / mL) e IFN & IL-10 (RQ médio dos 2 biomarcadores $>4,5$ & $\leq 0,5$). As estatísticas das colunas foram utilizadas para calcular a proporção de indivíduos que exibem status distinto da memória resultante, referida como “nenhum” (□), PRNT (▢), IFN & IL-10 (▣) e ambos (■). O status de memória resultante dentro de cada categoria, conforme determinado pelos dois biomarcadores PRNT e IFN & IL-10, foi exibido em gráficos de pizza. As diferenças significativas em $p < 0,05$ (teste Qui-quadrado) da memória resultante foram representadas pelas letras “a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f”, quando comparados os grupos NV(day0), PV(day30-45), PV(year1-9), PV(ano10-11), NV(day0) & PV(year10-11) e PV(day30-45) & PV(year1-9) respectivamente.

6 DISCUSSÃO

Durante anos, a orientação convencional da OMS estipulava que a vacinação contra Febre Amarela induzia uma imunidade protetora que se iniciava rapidamente após a administração da vacina e requeria um reforço a cada 10 anos. Recentemente, esta recomendação foi contestada, uma vez que o SAGE (Strategic Advisory Group of Experts) revisou a recomendação sobre esta imunização e concluiu que uma dose única de vacina antiamarílica seria suficiente para conferir uma imunidade vitalícia (14). Foi proposto que o "reforço" a cada 10 anos após a vacinação primária não seria necessário, sugerindo que a duração da imunidade após a primovacinação poderia durar vários anos em mais de 80% dos indivíduos vacinados (46-53). No entanto, a Autoridade Sanitária brasileira, o Ministério da Saúde, ainda mantém a recomendação original de uma dose reforço após 10 anos da primovacinação (54).

A alteração proposta no protocolo de vacinação contra a FA suscitou um debate mundial, uma vez que as evidências clínicas em que este conselho se baseou foram limitadas. Vários relatos usados para apoiar a nova recomendação foram conduzidos em coortes de áreas não-endêmicas ou regiões sem cobertura de vacinação contra FA, e a maioria deles incluiu um pequeno número de indivíduos (55-58).

Considerações especiais para as populações selecionadas deveriam ter sido consideradas, uma vez que entre os estudos que abordaram a duração da imunidade por mais de 10 anos após a vacinação contra Febre Amarela e que foram realizados com residentes de áreas com cobertura de vacinação, demonstraram uma diminuição crítica dos anticorpos neutralizantes antiamarílicos em mais de 25% dos indivíduos vacinados (49,50,52).

Entre os múltiplos fatores que podem afetar a resposta imunológica desencadeada pela vacina antiamarílica, o background genético (59) e as diferenças ambientais (60) têm sido considerados características relevantes. O estudo histórico mais representativo foi desenvolvido por Poland e colaboradores (1981) (47) e relatou a persistência de anticorpos neutralizantes em 78,4% dos vacinados, mais de 30 anos após a vacinação primária. No entanto, este estudo foi realizado em veteranos da Segunda Guerra Mundial, que viviam no Texas, EUA. É importante mencionar que esses sujeitos, residentes de área não endêmica para Febre Amarela e sem cobertura

vacinal, não teriam experimentado os supostos eventos de exaustão imunológica que poderiam contribuir para a diminuição da memória como relatado anteriormente (60).

Por outro lado, um outro estudo mostrou níveis mais baixos de resposta de anticorpos neutralizantes após a vacinação contra FA em adultos saudáveis de ascendência africana ou hispânicos quando comparados com descendência europeia mista, sem diferenças relacionadas à idade nas respostas da vacina. Constantemente, a menor persistência da memória humoral e celular foi encontrada em indivíduos africanos após a vacinação anti-amarela (60). Estes estudos objetivaram o impacto da revacinação na imunidade celular em indivíduos vivendo em áreas endêmicas para Febre Amarela. Foi demonstrado que o microambiente imune afeta a resposta quantitativa e qualitativa à vacina anti-amarela. Os indivíduos que vivem em áreas endêmicas para Febre Amarela e contam com cobertura vacinal apresentaram uma redução da magnitude das respostas celulares e humorais à vacina, conforme determinado pelos títulos de PRNT e pela resposta de células T CD8⁺ específicas (60). No entanto, uma visão integrada dos correlatos de proteção que fornecem ferramentas práticas para monitoramento laboratorial no decorrer de uma linha do tempo da resposta imune induzida pela vacina anti-amarela ainda são limitados.

Em nosso estudo, realizamos uma investigação transversal incluindo voluntários residentes em áreas endêmicas para Febre Amarela categorizados de acordo com o tempo pós vacinação contra FA (17DD) que consistiu de grupos de indivíduos não vacinados e grupos de indivíduos primovacinados em diferentes tempos pós vacinação. A caracterização da memória específica contra FA ao longo do tempo pós vacinação primária em uma população que vive em áreas endêmicas ou regiões com cobertura de vacinação contra FA proporciona uma visão mais robusta para subsidiar a revisão da recomendação para a necessidade de uma dose de reforço após 10 anos da vacinação primária anti-amarela (17DD). Com isso, aplicamos técnicas aperfeiçoadas para determinação dos biomarcadores mais adequados para realizar uma análise qualitativa e quantitativa da duração da imunidade celular e humoral após a vacinação contra Febre Amarela.

Nossos resultados demonstraram que a memória efetora de células T CD4⁺ e CD8⁺, células B de memória clássica, bem como os títulos de PRNT diminuem no grupo de pacientes - PV(year10-11), indicando uma fragilidade das respostas de memória depois de 10 anos da vacinação primária anti-amarela (dados publicados -

84). Os resultados da coorte africana citados anteriormente estão de acordo com os nossos resultados, indicando que os subconjuntos de células T e B de memória específicos podem ser alterados na presença de um meio imunitário distinto como evidenciado por títulos de anticorpos neutralizantes baixos após 6 anos de vacinação e níveis indetectáveis depois de períodos de tempo mais longos (38,60).

Durante a imunização, bem como na infecção, um repertório específico de células T de memória (antígeno específico), permanece relativamente constante e é mantido por proliferação homeostática impulsionada por citocinas pró-inflamatórias bem como modulada por citocinas reguladoras (61). Essa afirmação corrobora com nossos achados, onde Campi-Azevedo e colaboradores (2016) demonstraram uma diminuição dos níveis de TNF- α e IFN- γ produzidas por células TCD4⁺ e TCD8⁺, juntamente com aumento dos níveis de células TCD4⁺IL-10⁺ ao longo do tempo pós vacinação contra FA (84). Esta coleção de células T de memória genuínas transmitem proteção por toda a vida contra esse patógeno em particular, ou pelo menos para as fases graves de uma segunda infecção.

Existem fortes evidências de que a exposição repetida ao antígeno melhora a geração e é condição *sine qua non* para induzir imunidade protetora artificial e respostas de células T de memória de longa duração (63-68). Contudo, ainda não está claro por que as vacinas às vezes falham na indução deste repertório robusto e altamente específico de respostas de células de memória em uma exposição singular ao antígeno da vacina. Por isso, pode ser necessária uma nova vacinação com uma dose de reforço para uma exposição adicional ao antígeno para obter respostas de células T de memória protetoras para coortes específicos de indivíduos (37,41,48,66-69,70). A fragilidade na recuperação da memória central e da memória efetora de células T CD4⁺ e CD8⁺, bem como anticorpos de neutralização, pode indicar que é necessária uma dose de reforço após a vacinação primária com 17DD para induzir respostas de células T de memória específica de longa duração(38).

No nosso estudo, demonstramos que a geração de uma proteção de longa duração baseia-se na indução de resposta específica e robusta de células de memória T CD4 reguladora e CD8 efetora (dados publicados - 84). As proporções relativas da memória central e da memória efetora no sangue diferem entre as células T CD4⁺ e CD8⁺, sendo a memória central predominante em CD4⁺ enquanto a memória efetora em CD8⁺ (62,69). As células T CD4⁺ são essenciais para os eventos imunológicos que

levam à montagem e secreção de anticorpo. Por outro lado, células T CD8⁺ reguladoras são críticas para a ativação e proliferação de células do sistema imunológico, bem como a manutenção da secreção de anticorpos pelas células B (37,48,70,71). O estabelecimento de uma resposta ótima de células T CD4⁺ de memória é extremamente importante e depende de estímulos de citocinas para manter os títulos de anticorpos neutralizantes elevados(37,48,70,71).

Nossos resultados demonstraram também, através da análise comparativa, que a vacinação primária desencadeia nos pacientes do grupo PV(day30-45) um aumento de vários biomarcadores relacionados com a memória fenotípica e funcional quando comparados aos indivíduos não vacinados NV(day 0). Este conjunto de biomarcadores incluiu sete biomarcadores fenotípicos (eEfCD8, eEfCD4, EMCD4, CMCD19, EMCD8, NCD19 e nCMCD19) e oito biomarcadores relacionados com a memória funcional (IFNCD4, IL-5CD8, TNFCD19, TNFCD4, IFNCD8, TNFCD8, IL-5CD19 e IL-5CD4). Nossos achados corroboram com dados anteriores de estudos longitudinais que relatam um aumento de células T CD8⁺ de memória 30 dias após a vacinação contra FA (72). De acordo com Akondy e colaboradores (2009), há uma expansão de células TCD8⁺ de memória caracterizadas pela falta de CCR7, perda de Ki-67 e re-expressão de Bcl-2 (72). Foi proposto que a diferenciação de memória é um processo gradual e contínuo, resultando em mudanças sutis no pool de memória que podem não ser óbvias durante um curto período de tempo (72). A expressão uniforme de CD27 foi observada nos estádios de memória precoce (3 meses) e tardio (2 anos) com um aumento sutil ao longo do tempo em relação à expressão de CCR7 e CD127, dois marcadores associados com memória imune de alta qualidade (72). Blom e colaboradores (2013) também relataram a rápida expansão das células T CD8⁺ efetoras após a vacinação primária com a vacina contra FA (dia 15 após vacinação), com o fenótipo mais prevalente positivo para PD-1 e negativo para CCR7 e CD45RA. No estágio de memória no dia 90, este fenótipo PD-1⁺ CD45RA⁻ tinha mudado para uma perda de PD-1 e re-expressão de CD45RA (73). Além disso, estes autores demonstraram que entre as células T CD8⁺ polifuncionais, caracterizadas por pelo menos dois fenótipos, a positividade para IFN- γ foi uma observação evidente nos dias 10, 15 e 90 (73). O aumento de IFN- γ em conjunto com a IL-5 produzida pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ já foi relatado no dia 30 após a vacinação primária com a vacina antiamarílica (74).

No nosso estudo, a maioria dos biomarcadores identificados no dia 30-45 permaneceu consistentemente presente no grupo de indivíduos 1-9 anos após a vacinação primária com 17DD, mas com uma clara perda de magnitude de todos os biomarcadores relacionados com a memória em comparação com o grupo de referência PV(day30-45). A diminuição dos biomarcadores relacionados à memória imune pós vacinação observada no grupo de indivíduos PV(year10-11) não foi influenciada pela idade na vacinação primária. Estes resultados corroboram com estudos anteriores que demonstraram que a idade não afeta o índice de soroneutralização detectado no dia 30 após vacinação primária contra FA, ao comparar indivíduos com idade inferior a 40 anos e aqueles com 40 anos de idade ou mais (59).

Estudos que abordam o declínio ao longo do tempo da resposta imunológica provocada pelas vacinas contra FA demonstraram previamente que os anticorpos neutralizantes, assim como a resposta de células T específicas para FA, exibem uma diminuição dependente do tempo após a vacinação primária (38,46,47).

Por consenso, a presença de altos títulos de PRNT é considerada o "padrão-ouro" para monitorar a proteção desencadeada pela vacinação antiamarílica (75). Nesse sentido, também está bem documentado que a revacinação pode aumentar efetivamente os títulos de PRNT quando a sorologia pré-booster é baixa ou negativa (76,77). No entanto, alguns estudos propuseram que os títulos de PRNT encontrados em indivíduos revacinados não diferem daqueles observados em vacinados primariamente (48,52). Porém, nossos resultados demonstraram que há uma diminuição dos títulos de PRNT juntamente à queda de células T CD8⁺ efetoras após 10 anos da primeira vacinação, sugerindo que uma dose de reforço da vacina 17DD é necessária após a vacinação primária (dados publicados-84). Foi relatado anteriormente que a persistência reduzida de células T e B de memória observadas em voluntários pré-imunizados podem ser reforçadas por revacinação, sugerindo que, regimes revacinação podem ser necessários para manter a proteção em áreas sob risco de transmissão de FA (60).

Os dados gerados neste trabalho nos deram sustentação para expandirmos a gama de biomarcadores fenotípicos e relacionados à memória funcional além dos ensaios PRNT. Com esse objetivo, trabalhamos para identificar biomarcadores complementares para monitorar a duração da memória frente a vacinação 17DD. A

análise de conjuntos de intersecção entre os grupos de estudo apontou 10 biomarcadores como possíveis correlatos de proteção comumente presentes em mais de 50% dos voluntários nos grupos PV(day 30-45) e PV (year1-9), incluindo eEfCD4, EMCD4, CMCD19, EMCD8, IFNCD4, IL-5CD8, TNFCD4, IFNCD8, TNFCD8 e IL-5CD4. Destes 10 biomarcadores comuns, EMCD8 e IL-5CD4 foram eleitos como os dois biomarcadores mais promissores a serem empregados (Top-Two), juntamente com os títulos de PRNT, para monitorar a duração da imunidade celular e humoral após a vacinação contra FA. Utilizando este conjunto selecionado de biomarcadores para definir a memória resultante, nossa descoberta demonstrou diminuição notável da memória resultante, juntamente com a falta total de atributos relacionados à memória encontrados em 22% dos voluntários no grupo PV(year10-11).

A expressão gênica de IFN mostrou-se aumentada significativamente nos indivíduos vacinados em relação aos indivíduos não vacinados NV(day0) e diminuiu consideravelmente no grupo PV(year10-11). Os IFNs do Tipo I, aumentam a expressão de proteínas com atividade antiviral direta, tais como ISG20 e OAS1, 2 e 3, que conduzem à degradação do RNA viral e inibem a replicação viral (78). Já a expressão de IL-10, apresentou-se com um perfil inverso, houve uma queda significativa da expressão desta citocina nos indivíduos dos grupos PV(day30-45) e PV(year1-9) em relação ao grupo NV(day0) e aumentou significativamente no grupo PV(year10-11). Como o efeito principal da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- β e ainda a proliferação de células do tipo 1, diminuindo ainda a função citolítica e secretora de citocinas por estas células (79), esse resultado se torna extremamente relevante. Outros biomarcadores também apareceram como possíveis candidatos à correlatos de proteção, são eles: CCL5, quimiotático para células T, eosinófilos e basófilos, e desempenha um papel ativo no recrutamento de leucócitos para locais inflamatórios (80); CXCL8, que é um mediador chave associado a inflamação, onde desempenha um papel fundamental no recrutamento e degranulação de neutrófilos quimiotaxia em células-alvo e indução de fagocitose (81); TNF, citocina pró-inflamatória, que participa sistemicamente nos processos inflamatórios (82); e IL-12, que estimula a produção de INF- γ potencializa as funções citotóxicas dos LT (83).

Porém estes biomarcadores não apresentaram um desempenho tão satisfatório quanto IFN e IL-10. Em suma, a análise combinada da expressão gênica de IFN e IL-

10, juntamente com os títulos de PRNT, apresentaram-se como melhor desempenho para monitorar a memória imunológica pós vacinação antiamebílica. E além disso, quando estes biomarcadores foram utilizados para definir a memória resultante, eles demonstram uma diminuição importante dessa memória nos voluntários do grupo PV(year10-11).

A fim de identificar possíveis correlações entre os biomarcadores de expressão gênica, com biomarcadores de memória fenotípica e memória funcional, foi construída uma rede de correlações de biomarcadores, e nossos resultados demonstraram que os biomarcadores de expressão gênica dos grupos PV(day30-35) e PV (year1-9) se correlacionam com maior intensidade com os atributos de memória fenotípica e memória funcional em relação aos grupos NV(day0) e PV(year10-11). Porém como essas correlações foram detectadas inespecificamente ao longo de toda a rede (correlações entre os atributos fonte, independente do grupo de estudo, com vários atributos destino), consideramos que os biomarcadores de expressão gênica foram complementares e não substitutivos aos biomarcadores fenotípicos e funcionais para determinação da memória após a vacinação primária antiamebílica.

Diante disso, nossos achados demonstraram que a análise simultânea da imunidade celular e humoral específica contra FA utilizando os biomarcadores selecionados (EMCD8, IL-5CD4 -análises fenotípicas e funcionais- e PRNT) e (IFN, IL-10 -análise de expressão gênica- e PRNT) é uma ferramenta útil para monitorar as respostas da vacina antiamebílica e a persistência da memória em populações distintas. Portanto, nossos resultados contribuem para a manutenção das diretrizes nacionais de políticas de imunização atuais que recomendam uma dose de reforço, 10 anos após a vacinação primária de adultos.

7 EVIDÊNCIAS E CONCLUSÃO

Este estudo foi delineado com o propósito de gerar informações relativas a memória vacinal que possam subsidiar decisões sobre a revisão do calendário vacinal anti-amarelo no Brasil. Trata-se de um estudo descritivo com objetivo de avaliar a duração da imunidade pós-vacinação contra Febre Amarela 17DD em adultos, por meio da avaliação de marcadores da resposta imune humoral (anticorpos neutralizantes), da resposta imune celular (aspectos fenotípicos/funcionais de células T e B de memória) e análise da expressão gênica de biomarcadores em voluntários primovacinados.

Através dos resultados obtidos, foi possível estimar e comparar a proporção de soropositividade e a média de reatividade dos títulos séricos de anticorpos neutralizantes contra Febre Amarela em soros de adultos primovacinados, em diferentes tempos de vacinação, e os dados demonstraram que ao longo do tempo pós-vacinação anti-amarela há uma diminuição significativa dos títulos de PRNT. A correlação negativa encontrada entre os títulos de PRNT e os grupos de indivíduos após a vacinação reforçam a redução progressiva da memória imunológica humoral ao longo do tempo da vacinação (dados publicados-84).

De acordo com perfil fenotípico/funcional de linfócitos T e B em leucócitos do sangue periférico de adultos primovacinados, observou-se que os fenótipos de memória específicos (células T efetoras e células B clássicas) aumentaram significativamente 30-45 dias após a vacinação, e além disso, estes fenótipos tenderam a diminuir no grupo de indivíduos PV(year10-11). Houve também uma diminuição dos níveis de TNF- α e IFN- γ citocinas pró-inflamatórias, produzidas por células TCD4⁺ e TCD8⁺ durante a linha de tempo pós vacinal (dados publicados-84).

Através da análise comparativa da assinatura ascendente de biomarcadores de memória, foram identificados no grupo denominado referência PV(day30-45) 7 biomarcadores fenotípicos classificados como relevantes: eEf CD8, eEf CD4, EM CD4, CM CD19, EM CD8, N CD19 e nCM CD19 e 8 biomarcadores funcionais: IFN CD4, IL-5 CD8, TNF CD19, TNF CD4, IFN CD8, TNF CD8, IL-5 CD19 e IL-5 CD4. Esses biomarcadores mantiveram-se, em sua maioria, aumentados em PV(year1-9). Entretanto, no grupo de indivíduos com 10 a 11 anos após a primovacinação PV(year10-11), observou-se um retorno dos níveis basais destas células de memória.

Com o intuito de selecionar os melhores biomarcadores fenotípicos /funcionais dentre os mais relevantes, utilizados para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária antiamarílica (17DD), foram utilizadas ferramentas de biologia de sistemas. A análise de dados demonstrou que EMCD8 e IL-5CD4 foram os dois melhores atributos fenotípicos e funcionais capazes de segregar os grupos PV(day30-45) & PV(year1- 9) de NV(day0) & PV(year10-11). Além disso, a análise combinada de EMCD8 e IL-5CD4, para monitorar a memória imunológica pós vacinação antiamarílica, apresentou desempenho aumentado quando comparado à utilização individual de um único atributo (EMCD8 ou IL-5CD4).

Já o perfil de expressão gênica (citocinas e quimiocinas) induzidos *in vitro* pelo antígeno amarílico vacinal 17DD em cultura de células mononucleares de adultos, demonstrou que expressão de IFN estava aumentada significativamente nos indivíduos vacinados em relação ao indivíduos não vacinados NV(day0) e diminuiu consideravelmente no grupo PV(year10-11). No entanto, a expressão de IL-10, apresentou-se com um perfil inverso, demonstrando uma queda significativa da expressão desta citocina nos indivíduos dos grupos PV(day30-45) e PV(year1-9) em relação ao grupo NV(day0) e um aumento considerável no grupo PV(year10-11).

A análise combinada de IFN e IL-10, como biomarcadores de expressão gênica, apresentaram o melhor desempenho para monitorar a memória imunológica pós vacinação antiamarílica quando comparados a utilização individualmente destes marcadores. Este conjunto selecionado de biomarcadores foi utilizado para definir a memória resultante e demonstrou que há uma diminuição importante da memória imunológica nos voluntários do grupo PV(year10-11).

Sumarizando, nossos achados demonstraram que a análise simultânea da imunidade celular e humoral específica contra FA utilizando os biomarcadores selecionados fenotípicos, funcionais e humorais (EMCD8, IL-5CD4 e PRNT) complementares à biomarcadores de expressão gênica (IFN e IL-10) é uma ferramenta útil para monitorar as respostas da vacina antiamarílica e a persistência da memória em populações distintas.

O conjunto dos nossos resultados contribuem para a manutenção das diretrizes de políticas de imunização atuais do Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde do Brasil, que indica a necessidade da dose de reforço 10 anos após a vacinação primária com a vacina 17DD.

REFERÊNCIAS

1. MONATH, T.P. Yellow fever; na update. **Lancet Infect. Dis.** 2001; 1: 11-20.
2. TESH, R. B.; GUZMAN, H.; TRAVASSOS DA ROSA A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; DIAS L. B.; BUNNEL J. E.; ZHANG H.; XIAO S. Y. Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster Virologic Biochemical and Immunologic studies. **J. Infect. Dis.** 2001;183: 1431-6.
3. ISHAK, K. G.; WALKER, D. H.; COETZER, J. A.; GARDNER, J. J.; GORELKIN, L. Viral hemorrhagic Fevers with hepatic involvement: pathologic aspects with clinical correlations. **Prog Liver Dis.** 1982; 7: 495-515.
4. PETERS, C. J.; ZAKI, S. R. Role of the endothelium in viral hemorrhagic Fevers. **Crit. Care Med.** 2003; 30: S268-S73.
5. MONATH, T. P.; BARRETT, A. D. T. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. **Adv Virus Res.** 2003; 60: 343-95.
6. VASCONCELOS, P. F.; BRYANT, J. E.; DA ROSA, T. P.; TESH, R. B.; RODRIGUES, S. G.; BARRETT, A. D. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** 2004; 10: 1578-84.
7. CHANG, G. J.; CROPP, B. C.; KINNEY, R. M.; TRENT, D. W.; GUBLER, D. J. Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus. **J. Virol.** 1995; 69: 5773-80.
8. MONATH TP. Yellow fever: an update. **Lancet Infect Dis.** 2001; 1:11-20.
9. STAPLES JE, MONATH TP. Yellow fever: 100 years of discovery. **JAMA : the journal of the American Medical Association.** 2008; 300: 960-2.
10. FERREIRA KV, Rocha KC, CAPUTTO LC, FONSECA ALA, FONSECA FLA. Historical of yellow fever in Brazil and the importance of vaccination. **Arq Bras Cien Saude.** 2011; 36: 40-7.
11. PULENDRAN B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. **Nat Rev Immunol.** 2009; 9: 741-7.
12. JONKER EF, VISSER LG, ROUKENS AH. Advances and controversies in yellow fever vaccination. **Theor Adv Vaccines.** 2013; 1: 144-52.
13. GARDNER CL, RYMAN KD. Yellow fever: a reemerging threat. **Clinics in laboratory medicine.** 2010; 30: 237-60.
14. World Health Organization [internet]. Yellow fever. Factsheet n. 100. Geneva [May 2016; acesso em 08 de março 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/#>.
15. VASCONCELOS PFC. Febre Amarela. **Ver Soc Bras Med Trop.** 2003; 36: 275-93.
16. BEATY BJ, TESH RB, AITKEN THG. Transovarial Transmission of Yellow Fever Virus in *Stegomyia* Mosquitoes. **Am J Trop Med Hyg.** 1980; 29:125-32.

17. DUTARY BE and LEDUC.JW Transovarial transmission of yellow fever virus by a sylvatic vector, *Haemagogus equinus*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1981;75:128.
18. VASCONCELOS PFC. Febre Amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização Febre Amarela: reflexões sobre a doença. **Rev Bras Epidemiol**. 2002; 5:244-58.
19. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Travelers' Health. Yellow Book. Chapter 2. The Pre-Travel Consultation. Travel-Related Vaccine-Preventable Diseases. Yellow Fever [internet]. Atlanta. USA. [atualizada em 01 de outubro de 2015; acesso em 04 de janeiro de 2017]. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/yellow-fever>
20. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília: MS, 2009. 816 p. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf. Acesso em: 04 janeiro de 2017. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. ZigmanBrenner - <http://netra.cpqr.fiocruz.br/ph182/index.html>
21. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Centro de Informação em Saúde para Viajantes (Cives). Febre Amarela [internet]. Rio de Janeiro. [Acesso em 04/01/2016]. Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/fam/fam-iv.html>.
22. SEGURA MNO, MONTEIRO HAO, LOPES ES, SILVA OV, CASTRO FC, VASCONCELOS PFC. Encontro de *Aedes albopictus* no Estado do Pará, Brasil. **Rev Saúde Pública**. 2003; 37: 388-89.
23. FRANCO O. História da Febre Amarela no Brasil. **Rev Bras malarial doenças trop**. 1969; 21:315-520.
24. VAN DER STUYFT P, GIANELLA A, PIRARD M, CÉSPEDES J, LORA J, PEREDO C, et al. Urbanisation of yellow fever in Santa Cruz, Bolívia. **Lancet**. 1999; 353:1558-62.
25. GARDNER CL and RYMAN KD. Yellow Fever: A Reemerging Threat. **Clin Lab Med**. 2010; 30:237-60.
26. Pan American Health Organization [internet]. Yellow fever in Paraguay. EID Updates: Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Region of the Americas. Vol. 5. No. 5. [26 February 2008; acesso em 04 de janeiro 2017]. Disponível em: http://www.paho.org/us/index.php?option=com_content&view=article&id=48%3Amobilization-against-yellow-fever-in-paraguay-continues&Itemid=148&lang=en
27. Ministério da Saúde. COES – Febre Amarela - CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA SOBRE FEBRE AMARELA INFORME – Nº 20/2017. Acesso em 17 de março de 2017. Disponível em: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/13/COES-FEBRE-AMARELA-INFORME29-Atualizacao-10mar2017-13horas.pdf>
28. Secretaria da Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac. Divisão de Imunização. Divisão de Zoonoses e de Doenças Transmitidas por Vetores. Informe Técnico: Febre Amarela. São Paulo: SES/SP/CVE. 2015. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/imuni/pdf/IF15_VACINA_FAMARELA.pdf
29. Brasil. Ministério da Saúde. Febre Amarela Silvestre, Brasil, 2015. Boletim Epidemiológico - Volume 46 - nº 29 - 2015 - Reemergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2014/2015:

situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no período sazonal [acesso em 26 Jan. 2016]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/19/2015-032--FA-ok.pdf>

30. MONATH T.P., CENTRON M.S., TEUWEN D.E. Yellow Fever. In: Plotkin AS, Oresteina WA. **Vaccines**. 2008: 959-1055.
31. SILVEIRA-LEMOS D., MARTINS M. Â., SILVA M. L., HOMMA A., TEIXEIRA-CARVALHO A., MARTINS-FILHO O. A. Insights on yellow fever immune response following natural infection and vaccination. **Current Trends in Immunology**. 2008; 9: 1-14.
32. Background Paper on Yellow Fever Vaccine - SAGE Working Group. Version: 19 March 2013. Disponível em: http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2013/april/1_Background_Paper_Yellow_Fever_Vaccines.pdf
33. Ministério da Saúde. Nota informativa nº 143/CGPNI/DEVIT/SVS/MS. Recomendação da Vacinação Contra Febre Amarela Após declaração da OMS. [acesso em 20 fev. 2017]. Disponível em: <http://sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2015/02/Nota-Informativa-143-2014-Febre-Amarela.pdf>
34. COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES WITH YELLOW FEVER VACCINE. Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: Implications for the Brazilian National Immunization Program. **Vaccine**. 2007; 25: 3118-3123
35. CAMPI-AZEVEDO AC¹, DE ARAÚJO-PORTO LP, LUIZA-SILVA M, BATISTA MA, MARTINS MA, SATHLER-AVELAR R, et al. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. **PLoS One**. 2012;7:e49828.
36. MARTINS RM, MAIA MDE L, FARIAS RH, CAMACHO LA, FREIRE MS, GALLER R, et al. 17DD yellow fever vaccine: a double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. **Hum Vaccin Immunother**. 2013; 9(4):879-88.
37. CAMPI-AZEVEDO AC, DE ALMEIDA ESTEVAM P, COELHO-DOS-REIS JG, PERUHYPE-MAGALHÃES V, VILLELA-REZENDE G, et al. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. **BMC Infect Dis**. 2014 Jul 15;14:391.
38. COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES WITH YELLOW FEVER VACCINE. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. **Vaccine**. 2014; 32: 4977-84.
39. THEILER M, SMITH HH. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. **J Exper Med**. 1937; 65: 767-786.
40. CAMACHO, L.A.B.; FREIRE, M.S.; LEAL, M.F.; AGUIAR, S.G.; NASCIMENTO, J.P.; IGUCHI, T.; LOZANA, J.A.; FARIAS, R.H.G. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. **Rev. Saúde Pública**. 2004; 38: 671-678.
41. SIMÕES, M., CAMACHO, L.A.B., YAMAMURA, 572 A.M.Y., MIRANDA, E.H., CAJARAVILLE, A.C.R.A., FREIRE, M.S. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. **Biologicals**. 2012; 40:399-404.

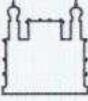
42. NIEDRIG M, LADEMANN M, EMMERICH P, LAFREZ M. Assessment of Igg antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. **Trop Med Int Health**. 1999; 4(12):867–71.
43. LIVAK K J. and SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. **Methods**. 2001; 25: 402–408.
44. MARK HALL, EIBE FRANK, GEOFFREY HOLMES, BERNHARD PFAHRINGER, PETER REUTEMANN, IAN H. WITTEN. The WEKA Data Mining Software: An Update. **SIGKDD Explorations**. 2009; Volume 11, Issue 1.
45. SWETS JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. **Science**. 1988; 240(4857):1285-93.
46. NIEDRIG M, STOLTE N, FUCHS D, HUNSMANN G, STAHL-HENNIG C. Intranasal infection of macaques with yellow fever (YF) vaccine strain 17D: a novel and economical approach for YF vaccination in man. **Vaccine** 1999;17(9-10):1206-1210.
47. POLAND JD, CALISHER CH, MONATH TP, DOWNS WG, MURPHY K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. **Bull World Health Organ**. 1981;59(6):895-900.
48. REINHARDT B, JASPERT R, NIEDRIG M, KOSTNER C, L'AGE-STEHR J. 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. **J Med Virol**. 1998;56(2):159-167.
49. GOMEZ SY, OCAZONEZ RE. Yellow fever virus 17D neutralizing antibodies in vaccinated Colombian people and unvaccinated ones having immunity against dengue. **Rev Salud Publica**. 2008;10(5):796-807.
50. GROOT H, RIBERIRO RB. Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to yellow fever 17 year(s) after vaccination with 17D vaccine. **Bull World Health Organ**. 1962;27(6):699-707.
51. DE MELO AB, et al. Description of a prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**. 2011;85(4):739-747.
52. ROSENZWEIG E, BABIONE R, WISSEMAN J. Immunological studies with group B arthropod borne viruses, IV. Persistence of yellow fever antibodies following vaccination with 17D strain yellow fever vaccine. **Am J Trop Med Hyg**. 1963;12:230-235.
53. COULANGE BODILIS H, et al. Long term persistence of yellow fever neutralizing antibodies in elderly persons. **Bull Soc Pathol Exot**. 2011;104(4):260-265.
54. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações Web site <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/427-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-amarela/11-febre-amarela/10771-vacinacao-febre-amarela>. Updated march 25, 2014. Accessed October 28, 2015.
55. GAUCHER D, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. **J Exp Med**. 2008;205(13):3119-3131.

56. WIETEN RW, et al. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination. **PLoS One**. 2016;11(3): e0149871.
57. GOTUZZO E, YACTAYO S, CORDOVA E. Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2013;89(3):434-444.
58. FUERTES MARRACO SA, et al. Long-lasting stem cell-like memory CD8+ T cells with a naïve-like profile upon yellow fever vaccination. **Sci Transl Med.**2015;7(282):282–348.
59. MONATH TP, ET AL. Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (ARILVAX and YF-VAX) in a III multicenter, double-blind clinical trial. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2002;66(5):533-541.
60. MUYANJA E, et al. Immune activation alters cellular and humoral responses to yellow fever 17D vaccine. **J Clin Invest.** 2014;124(7):3147-3158.
61. RAVINDRAN R, KHAN N, NAKAYA HI, LI S, LOEBBERMANN J, MADDUR MS, PARK Y, JONES DP, CHAPPERT P, DAVOUST J, et al. Vaccine activation of the nutrient sensor GCN2 in dendritic cells enhances antigen presentation. **Science.** 2014; 343:313.
62. MACKAY LK, STOCK AT, MA JZ, JONES CM, KENT SJ, MUELLER SN, HEATH WR, CARBONE FR, GEBHARDT T. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. **Proc Natl Acad Sci.** 2012; 109:7037-42.
63. Tan WG, Jin HT, West EE, Penaloza, MacMaster P, Wieland A, Zilliox MJ, McElrath MJ, Barouch DH, Ahmed R. Comparative analysis of simian immunodeficiency virus gag-specific effector and memory CD8+ T cells induced by different adenovirus vectors. **J Virol** 2013; 87:1359-72
64. VIRNIK K, HOCKENBURY M, NI Y, BEREN J, PAVLAKIS GN, FELBER BK, BERKOWER I. Live attenuated rubella vectors expressing SIV and HIV vaccine antigens replicate and elicit durable immune responses in rhesus macaques. **Retrovirology** 2013; 10-99.
65. HATCH GJ, GRAHAM VA, BEWLEY KR, TREE JA, DENNIS M, et al. Assessment of the protective effect of Imvamune and Acam2000 vaccines against aerosolized monkey pox virus in cynomolgus macaques. **J Virol** 2013; 87:7805-15.
66. LEDGERWOOD JE, ZEPHIR K, HU Z, WEI CJ, CHANG L, et al. Prime-boost interval matters: a randomized phase 1 study to identify the minimum interval necessary to observe the H5 DNA influenza vaccine priming effect. **J Infect Dis** 2013; 208:418-22.
67. KHURANA S, WU J, DIMITROVA M, KING LR, MANISCHEWITZ J, et al. DNA priming prior to inactivated influenza A(H5N1) vaccination expands the antibody epitope repertoire and increases affinity maturation in a boost-interval-dependent manner in adults. **J Infect Dis** 2013; 208:413-7.
68. ODUNSI K, et al. Efficacy of vaccination with recombinant vaccinia and fowlpox vectors expressing NY-ESO-1 antigen in ovarian cancer and melanoma patients. **Proc Natl Acad Sci USA** 2012; 109:5797-802

69. CAMPBELL JJ, et al. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. **J Immunol** 2001; 166:877-84.
70. MILLER JD, et al. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. **Immunity** 2008; 28:710-22.
71. SHAW AC, GOLDSTEIN DR, MONTGOMERY RR. Age-dependent dysregulation of innate immunity. **Nat Rev Immunol** 2013; 13:875-87.
72. AKONDY RS, ET AL. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. **J Immunol**. 2009;183(12):7919-7930.
73. 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. **J Immunol**. 2013;190(5):2150-2158.
74. SILVA ML, et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. **Vaccine**. 2011;29(3):583-592.
75. MONATH TP. Treatment of yellow fever. **Antiviral Res**. 2008;78(1):116-124.
76. BONNEVIE-NIELSEN V, HERON I, MONATH TP, CALISHER CH. Lymphocytic 2',5'-oligoadenylate synthetase activity increases prior to the appearance of neutralizing antibodies and immunoglobulin M and immunoglobulin G antibodies after primary and secondary immunization with yellow fever vaccine. **Clin Diagn Lab Immunol**. 1995;2(3):302-306.
77. HEPBURN MJ, et al. Neutralizing antibody response to booster vaccination with the 17d yellow fever vaccine. **Vaccine**. 2006;24(15):2843-2849.
78. DENIS GAUCHER et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. **J Exp Med**. 2008; 205(13): 3119–3131.
79. PEDRO P. V. VARELLA & WILMA C. Neves Forte. Citokines: a review. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. 2001; 24(4):146-154.
80. MAGHAZACHI AA, AL-AOUKATY A, SCHALL TJ. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells". **Eur. J. Immunol**. 1996; 26 (2): 315–9.
81. NEHA DIXIT AND SCOTT I. SIMON.. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest. **Front Immunol**.2012; 3: 188.
82. TNF tumor necrosis factor [*Homo sapiens* (human)]Gene ID: 7124, updated on 5-Mar-2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>
83. MICHELE DEL VECCHIO et al. Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. **Clin Cancer Res**. 2007 13; 4677-85.
84. CAMPI-AZEVEDO AC, COSTA-PEREIRA C, ANTONELLI LR, FONSECA CT, TEIXEIRA-CARVALHOA, et al.Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. 2016; 12: 491-502.

ANEXOS

Anexo 1- Carta de Aprovação do Comitê de Ética



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisa René Rachou
 Comitê de Ética



CARTA DE APROVAÇÃO Nº 21/2010 – CEP / CPqRR / FIOCRUZ / MS

Protocolo CEP - CPqRR n°: 24/2010

Projeto de Pesquisa: "Duração da Imunidade Pós-vacinação contra Febre Amarela em Adultos". Gill.

Pesquisadora Responsável: Clindo Assis Martins-Filho

Instituição Realizadora: Centro de Pesquisa René Rachou

CAAE: 0024.0.245.000-10

Após submissão e análise criteriosa do protocolo em questão, no Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou, constatamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 196/96 CNS, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR / FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições à ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela homologação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: PROJETO APROVADO.

Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios:

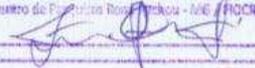
- Parcial 01: Novembro 2011;
- Parcial 02: Novembro 2012;
- Final: Novembro 2013.

Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Belo Horizonte, 30 de Agosto de 2010.

APROVADO

Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos
 Centro de Pesquisas René Rachou - MG / FIOCRUZ





João Carlos Pinto Dias
 Coordenador do CEP/CPqRR
 Dr. João Carlos Pinto Dias
 COORDENADOR
 COMITÊ DE ÉTICA

Av. Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto - 30190-002, Belo Horizonte - MG - Brasil
 Tel.: 55 0xx31 3295 3066 (ramal 181) Fax: 55 0xx31 3295 3115 http://www.cpqrr.fiocruz.br

Anexo 2- Artigo Científico Publicado

O artigo científico apresentado a seguir corresponde aos objetivos específicos 1 e 2:

1. Estimar e comparar a proporção de soropositividade e a média de reatividade dos títulos séricos de anticorpos neutralizantes contra Febre Amarela em soros de adultos primovacinados, em diferentes tempos de vacinação;
2. Avaliar o perfil fenotípico/funcional de linfócitos T e B de memória, induzido *in vitro* pelo antígeno amarílico vacinal 17DD em cultura de células mononucleares do sangue periférico de adultos primovacinados, em diferentes tempos de vacinação.

Título: Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination

Autores: Ana Carolina Campi-Azevedo*, Christiane Costa-Pereira*, Lis R. Antonelli, Cristina T. Fonseca, Andréa Teixeira-Carvalho, Gabriela Villela-Rezende, Raiany A. Santos, Maurício A.

Batista, Fernanda M. Campos, Luiza Pacheco-Porto, Otoni A. Melo Júnior, Débora M. S. H. Hossell, Jordana G. Coelho-dos-Reis, Vanessa Peruhype-Magalhães, Matheus F. Costa-Silva, Jaquelline G. de Oliveira, Roberto H. Farias, Tatiana N. Noronha, Jandira A. Lemos, Vanessa dos R. von Doellinger, Marisol Simões, Mirian M. de Souza, Luiz C. Malaquias, Harold R. Persi, Jorge M. Pereira, José A. Martins, Marcos Dornelas-Ribeiro, Aline de A. Vinhas, Tatiane R. Alves, Maria de L. Maia, Marcos da S. Freire, Reinaldo de M. Martins, Akira Homma, Alessandro P.M. Romano, Carla M. Domingues, Pedro L. Tauil, Pedro F. Vasconcelos, Maria Rios, Iramaya R. Caldas, Luiz A. Camacho, and Olindo Assis Martins-Filho.

***Autoria compartilhada (igual contribuição)**

Revista: Human Vaccines & Immunotherapeutics,

Volume:12:2, p.491-502.

DOI: 10.1080/21645515.2015.1082693

Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination

Ana Carolina Campi-Azevedo¹, Christiane Costa-Pereira¹, Lis R Antonelli¹, Cristina T Fonseca¹, Andréa Teixeira-Carvalho¹, Gabriela Villela-Rezende¹, Raisyny A Santos¹, Maurício A Batista¹, Fernanda M Campos¹, Luiza Pacheco-Porto¹, Ottoni A Melo Júnior¹, Débora MSH Hossell¹, Jordana G Coelho-dos-Reis¹, Vanessa Peruhype-Magalhães^{1,3}, Matheus F Costa-Silva¹, Jaqueline G de Oliveira¹, Roberto H Farias¹, Tatiana G Noronha², Jandira A Lemos³, Vanessa dos R von Doellinger⁴, Marisol Simões⁵, Mirian M de Souza⁶, Luiz C Malaquias⁵, Harold R Persi⁵, Jorge M Pereira⁵, José A Martins⁵, Marcos Dornelas-Ribeiro⁵, Aline de A Vinhas⁵, Tatiane R Alves⁵, Maria de L Maia⁶, Marcos da S Freire⁷, Reinaldo de M Martins⁸, Akira Homma⁹, Alessandro PM Romano⁹, Carla M Domingues⁹, Pedro L Tauil⁹, Pedro F Vasconcelos⁹, Maria Rios¹⁰, Iramaya R Caldas¹¹, Luiz A Camacho¹², and Olindo Assis Martins-Filho^{1,4}

¹Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil; ²Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos-FIOCRUZ; Rio de Janeiro, Brazil; ³Secretaria de Estado de Saúde; Governo do Estado de Minas Gerais Belo Horizonte; Minas Gerais, Brazil; ⁴Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil; ⁵Instituto de Biologia de Rio de Janeiro, Brazil; ⁶Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos FIOCRUZ; Rio de Janeiro, Brazil; ⁷Secretaria de Vigilância em Saúde; Ministério da Saúde, Brazil; ⁸Universidade de Brasília Distrito Federal, Brazil; ⁹Instituto Evandro Chagas-IBIC; Anápolis, Goiás, Brazil; ¹⁰Center for Biological Evaluation and Research-CBER; US Food and Drug Administration (FDA); Silver Spring, MD USA; ¹¹Conselho Regional de Brasília-Distrito Federal, Brazil; ¹²Escola Nacional de Saúde Pública; FIOCRUZ; Rio de Janeiro, Brazil

[†]These authors equally contributed to this work.

Keywords: yellow fever, vaccine, cytokine, flow cytometry, memory cells and vaccination, duration of immunity

A single vaccination of Yellow Fever vaccines is believed to confer life-long protection. In this study, results of vaccines who received a single dose of 17DD-YF immunization followed over 10 y challenge this premise. YF-neutralizing antibodies, subsets of memory T and B cells as well as cytokine-producing lymphocytes were evaluated in groups of adults before (PVDay0) and after (PVDay30-45, PYear1-4, PYear5-9, PYear10-11, PYear12-13) 17DD-YF primary vaccination. YF-neutralizing antibodies decrease significantly from PYear1-4 to PYear12-13 as compared to PVDay30-45, and the seropositivity rates (PRNT₂₋₉Log₁₀U/ml) become critical lower than 90% beyond PYear5-9. YF-specific memory phenotypes (effector T-cells and classical B-cells) significantly increase at PVDay30-45 as compared to naïve baseline. Moreover, these phenotypes tend to decrease at PYear10-11 as compared to PVDay30-45. Decreasing levels of TNF- α and IFN- γ produced by CD4⁺ and CD8⁺ T-cells along with increasing levels of IL-10⁺CD4⁺T-cells were characteristic of anti-YF response over time. Systems biology profiling represented by hierarchic networks revealed that while the naïve baseline is characterized by independent micro-nets, primary vaccines displayed an imbricate network with essential role of central and effector CD8⁺ memory T-cell responses. Any putative limitations of this cross-sectional study will certainly be answered by the ongoing longitudinal population-based investigation. Overall, our data support the current Brazilian rational immunization policy guidelines that recommend one booster dose 10 y after primary 17DD-YF vaccination.

Introduction

Yellow fever, the original viral hemorrhagic fever, was one of the most feared lethal diseases before the

development of an effective vaccine.¹ The live attenuated Yellow Fever (17DD-YF and 17D-YF) vaccines are examples of a highly successful prophylactic intervention for controlling disease expansion.

© Ana Carolina Campi-Azevedo, Christiane Costa-Pereira, Lis R Antonelli, Cristina T Fonseca, Andréa Teixeira-Carvalho, Gabriela Villela-Rezende, Raisyny A Santos, Maurício A Batista, Fernanda M Campos, Luiza Pacheco-Porto, Ottoni A Melo Júnior, Débora MSH Hossell, Jordana G Coelho-dos-Reis, Vanessa Peruhype-Magalhães, Matheus F Costa-Silva, Jaqueline G de Oliveira, Roberto H Farias, Tatiana G Noronha, Jandira A Lemos, Vanessa dos R von Doellinger, Marisol Simões, Mirian M de Souza, Luiz C Malaquias, Harold R Persi, Jorge M Pereira, José A Martins, Marcos Dornelas-Ribeiro, Aline de A Vinhas, Tatiane R Alves, Maria de L Maia, Marcos da S Freire, Reinaldo de M Martins, Akira Homma, Alessandro PM Romano, Carla M Domingues, Pedro L Tauil, Pedro F Vasconcelos, Maria Rios, Iramaya R Caldas, Luiz A Camacho, and Olindo Assis Martins-Filho

*Correspondence to: Olindo Assis Martins-Filho; Email: oamf@cpqpr.fiocruz.br

Submitted: 05/13/2015; Revised: 07/24/2015; Accepted: 08/10/2015

<http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1082693>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The moral rights of the named author(s) have been asserted.

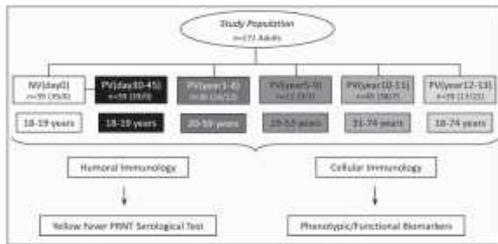


Figure 1. Flowchart illustrating the study population and experimental design. The study was based on two branches: The humoral (A) and cellular (B) immunology analysis. The eligible population comprises 171 adults. Blood collections (without anticoagulant for humoral analysis and in heparinized tubes for cellular immunology assessment) were performed prior vaccination (0/day0 (n=30)) and at different timepoints after primary vaccination: PVday30-45 (n=30); PVyear1-4 (n=30); PVyear5-9 (n=30); PVyear10-11 (n=30) and PVyear12-13 (n=30).

For the 17D-YF vaccine, a single vaccination was proposed as protective and viral neutralizing antibodies could be detected up to 30 y post-vaccination in doses pre-established by World Health Organization.² A single immunization with YF vaccines induced a strong immune response driven by several cytokines and chemokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-2 and MIP-1 β .^{2,3} Viral-neutralizing antibody titers have been used to define immunogenicity and protection; however the establishment of a memory CD8⁺ T-cell response was shown to be paramount for the duration of immunity.³

In fact, recent studies have shown controversy in regards to the duration of immunity of a single-dose 17DD-YF immunization.^{1,5} Several studies usually define and characterize the duration of immunity taking into account development of the viral-neutralizing antibodies measured by the Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT), disregarding the importance of the cellular responses in the maintenance of specific immunity.^{3,6} A broad and polyfunctional human memory CD8⁺ T-cell response was measured in primary vaccines supporting the finding that a single shot of 17D-YF vaccine is protective against Yellow Fever.^{2,9} It is well described, however, that continuous antigen exposure is necessary for the generation of a strong memory response, which gives rise to a controversial discussion on whether one single immunization with 17DD-YF vaccine is sufficient for the life-long protection.^{5,10} It is clear that a better understanding of the several immunological correlates of protection among cellular responses upon YF vaccination is needed in order to provide insight into the mechanisms that lead to successful and long-lasting immunization, which are yet to be fully described. In addition, it is not clear when re-exposure to antigen by re-vaccination would be critical for the development of efficient memory subsets in the context of the 17DD-YF vaccination. Previous recent study has reported decreased seropositivity in 17DD-YF vaccinated subjects after PVyear5-9,

which may indicate failure in primary immunization, or waning of protective immunity to levels below the protection threshold after 5 to 10 y after vaccination.⁴

Considering the above, the present study aimed at evaluating several subsets of memory T cells and their timeline in 17DD-YF primary vaccinated adults. The current results demonstrate a descendent trend of several memory subsets over time among 17DD-YF vaccinees, which highly advises for a booster dose 10 y after primary 17DD-YF vaccination.

Results

Humoral immunogenicity kinetics upon 17DD-YF primary vaccination: Decreased PRNT titers after 10 y of immunization

Figure 2 shows the kinetics of neutralizing antibody in 17DD-YF vaccinated adults over 10 y. Six time-points referred as NVday0; PVday30-45; PVyear1-4; PVyear5-9; PVyear10-11 and PVyear12-13 were evaluated. The median PRNT titers decrease progressively along time from the highest at PVday30-45 (4.1Log₁₀U/ml) to the lowest at PVyear10-11 and PVyear12-13 (3.3Log₁₀U/ml) (Fig. 2A).

Despite the significant decrease on the median PRNT titers observed at PVyear1-4 (3.51Log₁₀U/ml) as compared to the reference time-point (PVday30-45 = 4.1Log₁₀U/ml), the seropositivity rate (PRNT \geq 2.9Log₁₀U/ml) significantly decreased from 95% observed at PVday30-45 to 82% and 71% at PVyear5-9 and PVyear10-11, respectively. Surprisingly, the seropositivity rate increases from 71% at PVyear10-11 to 85% at PVyear12-13 with an evident cluster of vaccinees presenting high PRNT titers (\geq 4.0Log₁₀U/ml), which resembles the ones observed at PVday30-45 (Fig. 2A, B). A negative correlation found between PRNT titers and time-points after 17DD-YF primary vaccination reinforce the progressive reduction of PRNT titers along time of vaccination (Fig. 2C).

Fragility of effector memory T-cells and classical memory B-cells after 10 y of vaccination

Figure 3 shows the cellular immunology components in 17DD-YF vaccinated adults up to 13 y of immunization. Six groups were referred by their time after primary vaccination and classified as NVday0; PVday30-45; PVyear1-4; PVyear5-9; PVyear10-11 and PVyear12-13. Distinct gating strategies were applied to determine a range of T and B-cell memory phenotypic/functional subsets (Fig. 3A, B, respectively). The phenotypic features including, T-cell subsets (naïve, early effector, central memory and effector memory) and B-cell subsets (naïve, classical memory and nonclassical memory)

were expressed as YF-cultured/control culture indexes as described in methods. The phenotypic features were evaluated initially in paired-wise fashion. For this approach, samples from PVday30-45 were paired to their respective baseline (NVday0) and then compared accordingly with significant differences highlighted by *. Subsequently, a comparative analysis was performed by comparing each group with the reference group (PVday30-45).

The YF-specific memory phenotypes - effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cells along with classical memory B-cells - significantly increased at PVday30-45 as compared to NVday0 baseline (Fig. 3C). The early effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cells as well as the classical memory B-cells (Fig. 3C, D, respectively) are decreased in PVyear10-11 indicating the fragility of effective T and B cell recall after 10 y of immunization.

The balance between pro-inflammatory versus regulatory response shifts along time

Figure 4 displays the results of intracytoplasmic cytokine analysis of CD4⁺, CD8⁺ and B cells after *in vitro* YF-specific stimulation. Significant increases in intracytoplasmic TNF- α and IFN- γ in CD4⁺

and CD8⁺ T-cells besides higher levels of IL-10⁺CD4⁺T-cells were observed along time (Fig. 4C). Increased IL-5 production was also observed in CD4⁺ T-cells and B-cells as early as PVday30-45 (Fig. 4C, D, respectively). A decrease of YF-specific T and B-cell responses with reduced TNF- α ⁺ and IL-5⁺ CD4⁺ T-cells and B-cells and increased IL-10⁺ CD4⁺ T-cells and B-cells were important changes observed in PVyear10-11. Moreover, decreased levels of TNF- α -producing CD8⁺ T-cells and increased of IFN- γ ⁺ CD8⁺T-cells were observed in PVyear12-13 (Fig. 4C).

Figure 5 shows the representation of the immunological subsets tested at each time point, plotted in radar graphs. Memory

features were plotted on the left half, while the cytokine-producing B and T-cells were plotted at the right half of each graph. The inner circle represents the 50th percentile, which was taken as threshold to define higher (*) and lower production. Before primary vaccination, the radar graph displays a small area, almost contained within the 50th percentile line, except by naïve, early effector and central memory phenotypes accompanied by IL-10⁺-secreting T-cells. There is a clear expansion of the area composed of both memory and cytokine-producing B and T-cells after vaccination and a discrete area expansion from PVday30-45 to PVyear5-9 (Fig. 5). Pro-inflammatory cytokine-producing T and B-cells exceed the threshold along with effector memory

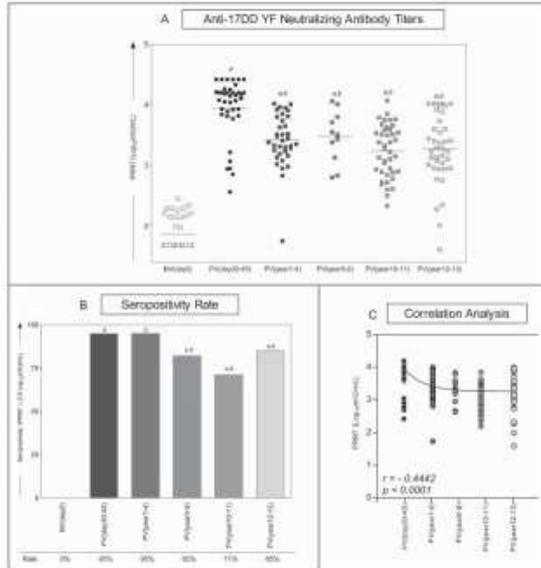


Figure 2. Immunogenicity following 17DD-YF primary vaccination. (A) Anti-YF neutralizing antibody titers were measured by PRNT carried out before NVday0 (n=39) and at different time-points after primary vaccination: PVday30-45 (n = 39); PVyear1-4 (n = 36); PVyear5-9 (n = 12); PVyear10-11 (n = 45) and PVyear12-13 (n = 39). PRNT antibody titers are expressed in log₁₀ mIU/mL. (B) Seropositivity rates were determined by the PRNT value of 2.9 log₁₀ mIU/mL as the cut-off point to segregate seropositive from seronegative samples and data analysis performed by multivariate logistic regression analysis, modeled as a function of the time (in months) elapsed since vaccination as categories. (C) Correlation analysis of Anti-YF neutralizing antibody titers after primary vaccination at different time-points using linear regression fit curve. Spearman's correlation r index and p values are displayed in the lower corner of the graph. Significant differences at p < 0.05 as compared to NVday0 time-point are displayed as "a" and differences as compared to PVday30-45 are displayed as "b".

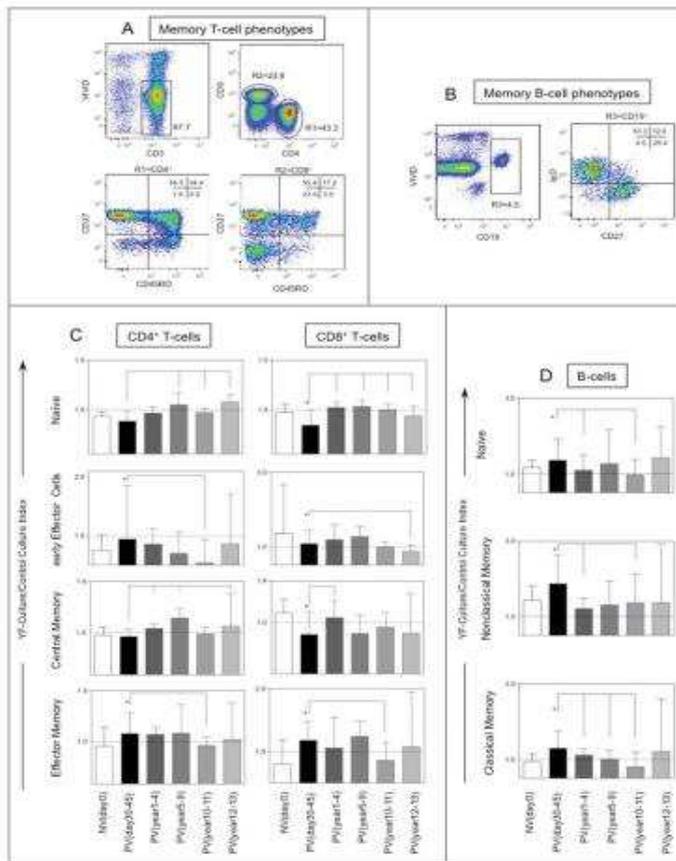


Figure 3. Timeline of memory phenotypic features following 17DD-YF primary vaccination. (A) Flow cytometric dot plots representing the memory T-cell phenotypes and (B) memory B-cell phenotypes. (C) memory T-cell phenotypes such as naïve, early effector, central and effector memory T-cells as well as (D) B-cell phenotypes such as naïve, nonclassical and classical memory are represented by YF-Culture/Control culture index plotted as bar graphs for healthy adults prior vaccination Nivday0 (n=39) and at different time-points after primary vaccination: P/Yday30-45 (n = 39); P/Yyear1-4 (n = 36); P/Yyear5-9 (n = 12); P/Yyear10-11 (n = 45) and P/Yyear12-13 (n = 39). Significant differences at $p < 0.05$ as compared to Nivday0 time-point are displayed as *** and differences as compared to P/Yday30-45 time-point are displayed as connecting lines.

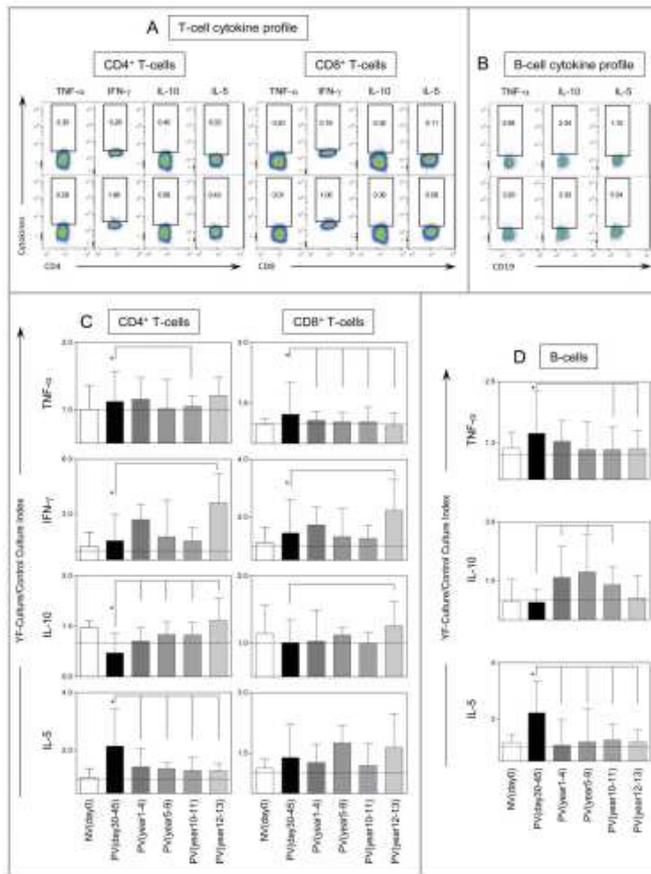


Figure 4. For figure legend, see next page.

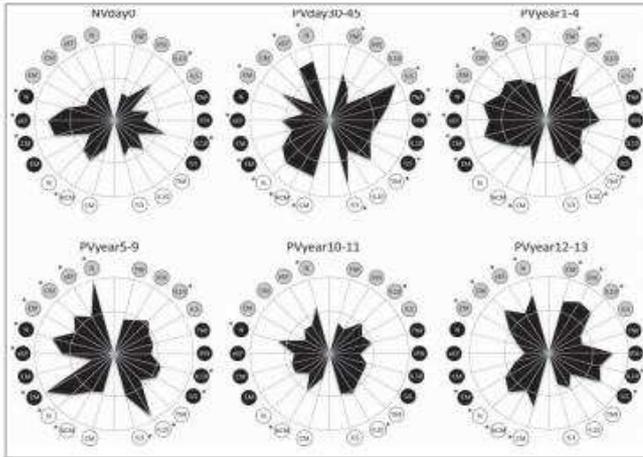


Figure 5. Phenotypic and functional memory analysis following 17DD-YF primary vaccination along time. Radar graphs represent the frequency of high producers of memory and functional phenotypic subsets relevant to assessing the immune response before and different times following primary vaccination. Memory phenotypic features were plotted on the left half, while the functional cytokine-producing T and B-cells were plotted at the right half of each radar graph. The inner circle represents the 50th percentile for each parameter, which was taken as threshold to define relevant frequency of subjects with higher levels of a given biomarker (*). Cracks in gray, black and white refer to CD4⁺, CD8⁺ T-cells and B-cells, respectively. N - naïve, eEF - early effector, CM - Central Memory and EM - Effector Memory.

T-cells and non-classical and classical B-cells in PVyear5-9. Singularly, IL-10⁺ B-cells are over-passing substantially the 50th percentile line, however the same is not observed for other IL-10-producing subsets. At PVyear10-11, the radar area reduces considerably, assuming similar profile observed in NVday0. Sudden expansion was observed later in PVyear12-13, with increase in the pro-inflammatory/regulatory cytokine-producing T-cells along with naïve and central memory T-cells and naïve and classical B-cells (Fig. 5).

Systems biology analysis - From micro- to macro-systems

To model the complex interactions between the biomarkers evaluated in the study, networks were assembled by assessing the

association between the cytokines profile from distinct cell subset and the memory phenotypes at each time-point (Fig. 6). The biomarker network observed in NVday0 was characterized by micro-nets formed with very few biomarkers. Following, PVday30-45 displayed abundantly rearranged biomarker network with several strong correlations among nodes. Interestingly, some negative correlations start to emerge in PVyear1-4, especially among memory phenotypes. Negative correlations between memory phenotypes and cytokine-producing T and B cells were noticed in a restricted selection of biomarkers participates in PVyear5-9. Several negative correlations emerge and are predominant in PVyear10-11 upsurge of subsets. An abundant and strongly connected macro-net is formed in PVyear12-13, which

Figure 4 (See previous page). Analysis of the functional B and T-cell profile following 17DD-YF primary vaccination over time. (A) Flow cytometric dot plots displaying the strategic gating of TNF- α , IFN- γ , IL-10⁺ and IL-5⁺-secreting CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets and (B) TNF- α , IL-10⁺ and IL-5⁺-secreting CD19⁺ B-cells. (C) Bar graphs representing variation of TNF- α , IFN- γ , IL-10 and IL-5 production within CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets and (D) production of TNF- α , IL-10 and IL-5 within B-cells, which were displayed as YF-Culture/Control culture index for healthy adults prior vaccination NVday0 (n=39) and at different time-points after primary vaccination: PVday30-45 (n = 39); PVyear1-4 (n = 36); PVyear5-9 (n = 12); PVyear10-11 (n = 45) and PVyear12-13 (n = 39). Significant differences at p < 0.05 as compared to NVday0 time-point are displayed as ** and differences as compared to PVday30-45 time-point are displayed as connecting lines.

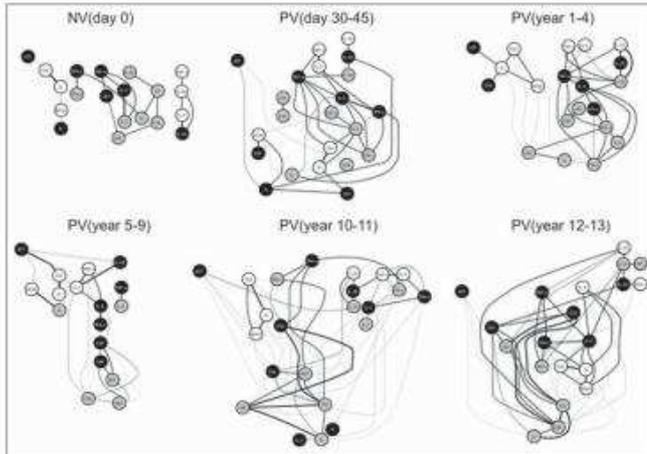


Figure 6. Systems biology analysis of 17DD-YF primary vaccination over time. Networks were assembled by assessing the association memory and functional phenotypic subsets relevant to assessing the immune response after 17DD-YF primary vaccination at each time-point. Only significant positive and negative correlations ($p < 0.05$) are displayed. Continuous lines represent direct or positive correlations, whereas dotted lines represent inverse or negative correlations defined by Spearman's correlation r index, as described in material and methods. The correlation index (r) defined the strength of association as moderate when $0.36 > r < 0.67$ (thin lines) or strong if $r > 0.68$ (thick lines). Circles in gray, black and white refer to $CD4^+$, $CD8^+$ T-cells and B-cells, respectively. N – naïve, eEF – early effector, CM – Central Memory and EM – Effector Memory.

is composed of several connections between memory phenotypes and pro-inflammatory/regulatory cytokine-secreting cells (Fig. 6).

Early effector $CD8^+$ T cells represent a satellite peripheral cell compartment with a negative and weak correlation with classical memory B cells. The satellite early effector $CD8^+$ T cell node displays different associations throughout time with specific and stronger associations with naïve B cells (PVyear1-4), with central memory B cells (PVyear5-9) and with $IL-10^+CD4^+$ T cells (PVyear10-11) (Fig. 6).

A preserved interaction among $IL-10^+B/IL-10^+CD4^+T/IL-10^+CD8^+$ T nodes (triple $IL-10$ node) is seen from PVday30-45 until PVyear12-13, except in PVyear5-9. $TNF-\alpha$ -producing cells seem to be key players within the net, connecting important associations between memory phenotypes and the triple $IL-10$ node. $TNF-\alpha$ -producing $CD8^+$ T-cells are separated from the major net in PVyear5-9, and this node is not connected to $IL-10$. These features are characteristic of a weakening net observed in PVyear5-9. $IL-5^+/IFN-\gamma^+/TNF-\alpha^+CD8^+$ T-cells are consistently connected after vaccination in all time-points except in PVyear5-9 and PVyear10-11. A highly connected triangle

formed by $IL-5^+/IFN-\gamma^+/TNF-\alpha^+CD8^+$ T-cells are observed in PVyear12-13 (Fig. 6).

In regards to the memory phenotypes and their association with other subsets, stronger correlations between central memory and effector memory $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cells are mainly observed in PVyear10-11 and PVyear12-13 (Fig. 6).

Discussion

Large scale YF vaccination has been very effective throughout the world. However, where vaccination campaigns have ceased and vaccination coverage has not been sustained, the disease has recurred, leading to major outbreaks in countries where the disease was considered as eradicated. In face of the endemic transmission of yellow fever virus, WHO recommends that all endemic countries ought to introduce YF vaccine into their routine vaccination programs, considering the efficacy and safety of YF vaccination.¹² Reliable but few data have been generated in regards to the duration of immunity associated with 17D-YF vaccination.^{7,9} WHO advises that single immunization of 17D-YF vaccine is sufficient for large-scale vaccination.¹¹ However, the same findings are yet to be

demonstrated for 17DD-YF vaccination, generating controversy on whether a booster dose is required for duration of memory to YF vaccines. It is possible that use of distinct subtypes of YF vaccines (17D-204, 17D-213 and 17DD) is not the major factor that contributes to the differences in the duration of immunity following YF vaccination, considering the very few genetic differences among these subtypes. However, it is important to mention that we have previously demonstrated that despite an overall similar mixed pro-inflammatory/regulatory cytokine pattern induced by the subtypes 17D-213 and 17DD, the 17DD subtype trigger a slight higher pro-inflammatory profile in the innate immunity compartment.⁷ This fact may count to putative differences in the duration of the immune response. Moreover, it is important to mention that the systematic review on the need of booster of yellow fever vaccination every 10 years,⁵ give important details about the studies used as evidence on duration of immunity in healthy individuals. The seven studies addressing the duration of immunity over 10 y were performed in residents in non-endemic countries or non-endemic areas in Brazil. A recent investigation of duration of YF vaccine¹⁸ has demonstrated that there is a significant difference in the duration of immune response in populations resident in endemic or non-endemic areas. In fact, this study have demonstrated that an activated immune microenvironment prior to vaccination impedes efficacy of the 17D-YF vaccine in an residents of endemic area (African cohort) as compared to non-endemic area (Swiss cohort) and suggest that vaccine regimens may need to be boosted in African populations to achieve efficient immunity. Moreover, this study showed that the reduced persistence of memory T and B cell responses in pre-immunized volunteers from Africa could be boosted by a second vaccination. These findings in association with the data presented in our investigation support the proposal of Brazilian authorities to still recommend a booster dose every 10 y in endemic and transition areas. In order to contribute to the understanding of the duration of memory responses after primary vaccination with 17DD-YF vaccine, in this study, neutralizing antibodies along with memory T-cell responses were evaluated in primary vaccinees from 45 d to 13 y after vaccination.

The results indicate that the effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, the classical memory B-cells as well as the median PRNT titres decreased at 3Vyear10-11, indicating a fragility of memory responses after 10 y of 17DD-YF primary vaccination. Recent findings support the results encountered in this study⁹ and reveal that an activated immune microenvironment^{12,13} prior to vaccination may impede efficacy of the 17D-YF vaccine and suggest that YF vaccination in pre-immunized volunteers should need a booster dose in order to achieve efficient immunity.¹⁰ The results in the African cohort are in agreement with the results found here for the Brazilian cohort, indicating that YF-specific T and B cell memory subsets may be altered in the presence of a distinct immune milieu as evidenced by low neutralizing antibody titres after 6 y of vaccination and undetectable levels after longer periods of time.^{4,10}

During infection as well as immunization, a specific repertoire of memory T-cell pool, which is specific for a particular antigen remains relatively constant and it is maintained through homeostatic proliferation driven by pro-inflammatory cytokines,

modulated by regulatory cytokines as well as sensor factors produced by antigen-presenting cells upon encountering antigen.¹⁴ This genuine memory T-cell collection conveys protection throughout life against that particular pathogen or at least halts severe stages of a second infection. It was recently shown that long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T-cells are fully functional even in the absence of persisting local antigen presentation in the tissue.¹⁵

There is strong evidence, however, that repetitive exposure to antigen does improve the generation and are *sine qua non* for inducing artificial protective immunity and long-lived memory T-cell responses.¹⁶⁻²¹ Even though highly hypothesized and scrutinized, it still remains unclear why vaccines sometimes fail in inducing this robust and highly specific repertoire of memory cell responses upon a singular exposure to the vaccine antigen. Therefore, re-vaccination with a booster dose for an additional antigen exposure or modification of the antigen delivery system using a homologous/heterologous prime-and-boost regimen may be required for eliciting conspicuous and protective memory T-cell responses for specific cohorts of individuals.¹⁸⁻²⁶ The fragility on memory recall of 17DD-YF-specific central memory and effector memory of CD4⁺ T and CD8⁺ T-cell responses, as well as neutralizing antibodies, may indicate that a booster dose is required after primary vaccination with 17DD-YF vaccine for eliciting YF-specific long-lived memory T-cell responses in humans.⁴

In this matter, generation of a long-lasting protection relies on inducing specific and robust memory and regulatory CD4⁺ T and CD8⁺ T-cell responses. The relative proportions of central memory and effector memory in blood differ in the CD4⁺ and CD8⁺ T-cell compartments; central memory is predominant in CD4⁺ whereas effector memory in CD8⁺.^{15,22} CD4⁺ T-cells are essential for the immunological events that lead to Ig class-switch and continuation of antibody assembly and secretion. On the other hand, CD8⁺ regulatory T-cells are critical for the activation and proliferation of immune cells as well as maintenance of antibody secretion by B cells.²⁶⁻²⁷ The establishment of optimal memory CD4⁺ T-cell response is extremely important and depends on cytokine stimuli for maintaining high neutralizing antibody titres.

Previous studies have demonstrated negative correlation of IL-4⁺CD4⁺ T-cells, as well as the positive correlation of TNF- α and negative correlation of IL-10⁺ in CD8⁺ T-cells with the levels of neutralizing antibodies.¹⁸ The present findings demonstrate that a regulatory network of IL-10-producing cell subsets (IL-10⁺B/IL-10⁺CD4⁺T/IL-10⁺CD8⁺T) is present in 1Vday30-45. Even though IL-10 circulating levels rise at even earlier stages, after only a few days post vaccination, this increase in IL-10 levels is observed at minimum doses of 17DD-YF vaccine and in a dose-independent manner, which may indicate that the increase in IL-10 is possibly a bystander outcome of the innate sensing immunity instead of direct effect of vaccination.²⁸ IL-10 kinetics correlates inversely with IFN- γ and TNF- α peak production, as well as the viremia peak post-vaccination, suggesting an important role of this cytokine in modulating the production of the first YF-specific effector function T-cell clones.²⁶

Interestingly, the triple IL-10⁺B/IL-10⁺CD4⁺T/IL-10⁺CD8⁺T association is not observed exclusively in PVyear5-9 after primary vaccination, in which very few and weak connections are observed. The results observed in this time-point along with withdrawal of the regulatory system may preclude the beginning of failure in recall responses to YF, in which a regulatory network is no longer necessary for maintaining homeostasis and balanced T-cell proliferation. Novel connections and intertwining of memory T-cell responses and cytokine-producing cells are observed at PVyear10-11 and PVyear12-13 accompanied by the regulatory IL-10 micro network, resembling the first years of primary vaccination.

However, stronger connections between CD4⁺ and CD8⁺ central memory and effector memory are now present. In agreement with these findings, a subtle increase in the seropositivity rates was observed at PVyear12-13, which may suggest that undisclosed re-vaccination could have occurred among participants of the study after 10 y of vaccination, which were not reported in the vaccine registration card. Another hypothesis to explain increased seropositivity at PVyear12-13 is the immunosenescence of regulatory responses in elderly vaccinees. Immunosenescence phenomenon is accompanied by weakening of regulatory events, leading to the remodeling of the immune system and its effector and memory functions. This new remodeled immune response may be composed of robust CD8⁺ T-cell responses as well as specific antibody production.²⁷

It is important to point out that the present investigation may present putative limitations that should be covered in further studies focusing on issues affecting the duration of protective immunity, such as: influence of age at primary vaccination, the impact of distinct number of viral particles/doses, intrinsic of the vaccine batches used at primary vaccination and the number of volunteers on each study groups. Several of these issues will be addressed by a 10 y follow-up longitudinal investigation already setup. This ongoing investigation includes a broader number of volunteers, covering a wide age range at primary vaccination and overcomes the matter of viral particles/doses by using a single vaccine batch. Then, the matter regarding the number of viral particles/dose will be properly covered, supporting a more confident data interpretation of the duration of immune response following primary vaccination. Moreover, the inclusion of a broad age-stratified study population will cover the matter regarding the influence of decade of age at primary vaccination on the duration of protective immunity. Any putative limitations of the cross-sectional experimental design of the present investigation (age and number of viral particles/dose at primary vaccination), will be properly addressed in the ongoing longitudinal population-based study.

In conclusion, altogether our findings confirm previous serologic data, which suggest that a booster dose of 17DD-YF vaccine should be given to Brazilian subjects in order to prevent a decline of seropositivity after primary vaccination. In these cases, one booster dose seems to be necessary to ensure longer protection, possibly sooner than currently recommended. Therefore, the present study supports the current Brazilian national immunization policy guidelines that recommend one booster dose 10 y after primary 17DD-YF vaccination in adults.

Patients and Methods

Study population

This study had formal approval from the Ethics Committee for studies with human subjects (CPqRR/FIOCRUZ #24/2010) and was conducted by the Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine. The protocol included the analysis of "humoral immunology" (neutralizing antibodies) and "cellular immunology" (phenotypic and functional memory-related biomarkers) in all subjects.

The study population consisted of 171 healthy adults (129 males and 49 females, age ranging from 18 to 74 y old) from army military units (RJ, Brazil) and health units from Alfenas (MG, Brazil).⁴ These geographic areas have been selected due to their low exposure to natural infection (areas with no epidemiological risks for the occurrence of sylvatic transmission of yellow fever), and with no cases of epizootic reports in non-human primates). It was important to minimize the chances of natural infection or second viral exposure that could lead to a natural boosting, which may interfere in the assessment of memory immunity elicited by the YF-vaccine.

The experimental design was structured first as a paired longitudinal arm to identify early correlates of protection at 50 to 45 d after primary vaccination (PVday30-45, ■ = 39) as compared to baseline observed in Non-Vaccinated conscripts (NVday0, □ = 39). The cross-sectional arm was structured in 4 groups, categorized according to the time after 17DD-YF primary vaccination (PVyear1-4, ■ = 36; PVyear5-9, ■ = 12; PVyear10-11, ■ = 45; PVyear12-13, ■ = 39) (Fig. 1).

Volunteers with seropositive results at baseline (PRNT₅₀ ≥ 2.9 Log₁₀ mLU/mL) were not included in this study. Primary vaccination was confirmed by consulting immunization cards or employee's records. All participants have signed a written consent form. Two blood samples were collected from each volunteer and included 5 mL of whole blood without anticoagulant for humoral immunology assay and 20 mL of heparinized whole blood for cellular immunology analyses.

Plaque Reduction Neutralization Test

Neutralizing antibody titer against Yellow Fever virus was defined by the Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) performed at Virologic Technology Laboratory of Bio-Manguinhos (LATEV, FIOCRUZ). This test was conducted as previously described.^{23,26} After blood collection, sera was obtained by centrifugation (400g, 10min, 18°C) of samples obtained from each participant. All sera samples were previously inactivated and submitted to serial two-fold dilutions, starting at 1:5, in 96-well tissue culture plates. A positive serum control for YF neutralizing antibody (internal standard), properly calibrated by the First International Reference Preparation (NIBSC code: YF), was included in each run of the PRNT. For neutralization step, each and every well received a yellow fever viral suspension (strain 17D 21377, lot UENVFB01, Dec 2011) at concentration about 50 plaque forming units per well. After neutralization time, a Vero cell suspension was added to the test and the plates were incubated to occur the adsorption of the virus not neutralized

and formation of the cell monolayer. After 6 d with semi-solid medium it was possible to count formed plaques. PRNT titer was defined as the reciprocal of the last serum dilution which reduced the plaque numbers in 50% relative to the virus control (included in each run test). Linear regression was used to determine neutralizing antibody titers, by interpolation of the dilutions corresponding to the plaque numbers immediately above and below the 50% endpoint value of the test. Titers expressed in mIU/mL were calculated relative to the antibody content in the International Reference Serum (143 IU/mL), which was used to determine the nominal value of the internal standard (1,115 mIU/mL). Therefore, it was possible to transform neutralizing antibody titer represented by dilution into mIU/mL. In this study, results are represented in Log_{10} mIU/mL. In order to segregate seropositive from seronegative samples, a cut-off point of 2.9Log_{10} mIU/mL was applied as described previously.²³

In vitro long-term lymphocytes culture

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were isolated from 14 mL of heparinized blood by density gradient centrifugation on Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, #H8889) as previously described.³³ Cell culture experiments were performed using 48-well microplates for 4h at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. For 17DD vaccine antigen stimulation, 1.0×10^6 PBMC were added per well, in a final volume of 800 μ l of complete RPMI-1640 (Gibco, # 23400-021) containing 5% heat-inactivated normal human AB serum, antibiotic/antimycotic solution (100U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 0.25 mg/mL amphotericin-B; Sigma, # P3539), and 2 mM L-glutamine (Wako, # G-6392). The final concentrations of stimuli established as optimal under the cell culture conditions employed were 250 LD₅₀ per well of live attenuated 17DD-YF vaccine (lot# 103VPCD15Z - Bio-Manguinhos - FIOCRUZ). Cells were incubated for 144 hours in the presence of 17DD vaccine antigen or medium (control culture). After stimulation, the cell suspension was stained for memory markers and intracytoplasmic cytokines by flow cytometry.

Memory lymphocyte phenotypic analysis

Following *in vitro* stimulation, cell suspension was washed in wash buffer (phosphate buffered saline [PBS], pH 7.2, supplemented with 0.5% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide, all from Sigma Chemical Company) and stained with Live/Dead Dye (Life Technologies, #L34955) for 15 minutes at room temperature, in the dark. After that, the cell suspension was incubated with a cocktail of several monoclonal antibodies for surface and memory molecules. The cocktail was comprised of: 1) Memory T-cells: FITC anti-CD4 (RPA-T4), PerCP-Cy5.5 anti-CD8 (SK1), PE anti-CD27 (M-T271) and PE-Cy7 anti-CD45RO (UCHL1) and 2) Memory B-cells: FITC anti-IgD (IA6-2), PE anti-CD27 (M-T271), PerCP anti-CD19 (HIB19) and APC-Cy7 anti-CD3 (SK7). All antibodies were purchased from BD Pharmingen. The cells were incubated for 30 minutes at room temperature, in the dark. After the incubation, the cell suspension was washed with FACS buffer, resuspended in FACS fixing solution (10 μ l paraformaldehyde,

10.2 g/L sodium cacodylate and 6.63 g/L sodium chloride, pH 7.2) and stored at 4°C in the dark until acquisition on BD LSR Fortessa (BD Biosciences).

Intracytoplasmic cytokine analysis

The analysis of intracytoplasmic cytokines in lymphocytes subsets was performed as described previously.^{28,29} After YF-specific stimulation, 10g/mL of Brefeldin A-BFA (Sigma, # P7651) was added and samples were re-incubated for an additional 4h at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Following incubation, the cultures were treated with 2mM ethylenediaminetetraacetic acid - EDTA, (Sigma, # ED2SS) and maintained at room temperature for 15 min. Following EDTA treatment, the wells were washed 3 times with 500 μ l of FACS buffer by centrifugation at 600g for 10min at room temperature. After additional centrifugation, the supernatant was discarded and the cell pellet was suspended in 500 μ l of FACS buffer. Briefly, cell suspension was stained by Live/Dead Dye (Life Technologies, #L34955) for 15 minutes at room temperature, in the dark and then stained with anti-human monoclonal antibodies: Qdot605 anti-CD3 (UCHT1/Invitrogen, #Q10054), APCe-Fluor780 anti-CD4 (GKI-Melioscience, #47-0049-42), PerCP anti-CD8 (SK1/BD Biosciences, #347314) and AlexaFluor700 anti-CD19 (HIB19/eBioscience, #56-0199-42). Following incubation at room temperature for 30 min in the dark, stained samples were washed, centrifuged at 600g for 10min at room temperature, and the supernatant discarded. The cell pellet was resuspended in 2mL of FACS permeabilizing solution (FACS buffer supplemented with 0.5% of saponin) and incubated for 10 min at room temperature in the dark. Following incubation, the samples were washed as described previously and then stained with Alexa Fluor 488 anti-IFN- γ (clone B27, #557718), PE IL-5 (clone JES1-39D10, #559332), APC IL-10 (clone JESS-19F1, #554707) and PE-Cy7 TNF- α (clone MAb11) (BD-PharMingen, #557647). After incubation for 30 min at room temperature in the dark, the cell suspension was washed with FACS permeabilizing solution first and then with FACS buffer, fixed with FACS fixing solution and stored at 4°C in the dark until acquisition on a BD LSR Fortessa (BD biosciences).

Flow cytometric acquisition and analysis

Flow cytometry acquisition was performed in a BD LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson), using the FACS DIVA software (BD biosciences). After acquiring 100,000 events/tube gated for lymphocytes, distinct gating strategies were used to analyze the different memory T and B-cells (Fig. 3A, B) as well as cytokine-expressing lymphocyte subsets (Fig. 4A, B) using FlowJo version 9.3.2 (TreeStar). All samples were first gated on singlets, then on live CD3⁺ cells, before excluding any potential aggregates, as well as disturbances due to variations in the flow rate (time gate), followed by gating on lymphocytes. Subsequently, CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were identified for memory analysis. T-cell subsets were defined by expression of CD45RO and CD27. Boolean gates were created from CD45RO vs. CD27 gates and the subpopulations of memory T cells defined as: naive T cells- CD4⁺ or CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁻; early

effector - CD4⁺ or CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁻; central memory - CD4⁺ or CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺; effector memory - CD4⁺ or CD8⁺ CD27⁻ CD45RO⁺; B-cell subsets (CD19⁺) were defined by expression of CD27 and IgD. Boolean gates were created from CD27 vs. IgD gates and the subpopulations of memory B cells defined as: naïve B cells - CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺; classical memory - CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻; nonclassical memory - CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺; cytokine-producing cells were defined by expression of CD4, CD8 or CD19 along with TNF- α , IFN- γ , IL-10 and IL-5. Boolean gates were created from CD4; CD8 or CD19 vs. cytokine gates (TNF- α , IFN- γ , IL-10 and IL-5) to define the frequency of cytokine⁺ cells.

Statistical analysis

In the multivariate analysis, the humoral immune response (indicated by Log₁₀ of titers in the multiple regression model and seropositivity in the logistic regression model) was modeled as a function of the time (in months) elapsed since vaccination as categories, including: NVday0; PVday30-45; PVyear1-4; PVyear5-9; PVyear10-11 and PVyear12-13. The statistical analysis of humoral immune response was performed using the software SPSS® (SPSS Inc., Chicago, IL).

In the analysis of cellular immune response, the memory lymphocyte phenotyping and intracytoplasmic cytokine of peripheral blood leukocytes initially yielded the percentage of memory phenotype and cytokine-positive cells. The memory phenotype and cytokine indexes were then calculated as the ratio between the percentages observed in stimulated culture over the percentage detected in the control culture. Statistical analyses between indexes of NVday0 and PVday30-45 were performed by Mann-Whitney test (unpaired non-parametric) and represented by “*.” Comparisons between indexes of PVday30-45 and other groups (PVyear1-4; PVyear5-9; PVyear10-11 and PVyear12-13) were performed using Kruskal-Wallis followed by a Dunn's post-test. The differences were demonstrated by connecting lines. Statistical significance was considered if $p < 0.05$, which was estimated by GraphPad Prism, version 5.0 (San Diego, CA).

Systems biology analysis

In order to further characterize the systemic phenotypic and molecular profiles of the immunological response induced by 17DD-YF vaccine over time, radar charts were plotted using the frequency of high producers following primary vaccination. To calculate the frequency of high producers, a global median of the YF-Culture/Control Culture ratio was estimated and used as a threshold to define high and low producers. The frequency of subjects with biomarkers levels higher than the global median cut-off was plotted in the radar graphs and relevant frequency (represented by *) were considered when the percentage of subjects with higher levels of a given biomarker exceeded the 50th percentile.

To assemble networks, spearman rank correlation test was performed to assess the positive and negative association between the memory phenotypes and intracytoplasmic cytokine production for all groups. These associations were mapped as networks,

in which each node represents a different biomarker. The nodes were connected according to their statistical correlation given by Spearman's test. The positive and negative correlations were significant when the $p < 0.05$. The correlation index (r) were applied to define the association strength as negative ($r < 0$), moderate ($0.36 > r < 0.67$) and strong ($r > 0.68$). Networks were displayed in a hierarchical layout plotted using the Cytoscape software (Version 3.1.0).

Disclosure

Eight authors (VRvD, MS, MSF, AMYY, AH, RMM, RHGF, MLSM) are employees at the 17DD-YF vaccine manufacturer (Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz), and 6 authors work in other units of Fundação Oswaldo Cruz (LRVA, CTF, LABC, IRC, ATC and OAMF). Bias from competing interest was prevented by: (1) collaboration of one general clinical Physician (HRP) with experience in infectious disease from Brazilian Army; (2) one general clinical Nurse (JACL) with experience in vaccine epidemiological vigilance from State Health Department; (3) 2 Immunologists (LCCM and MR) from Brazilian Research Academy and United States Department of Health; and (5) 4 independent professionals working at Undergraduate student (RAS), PhD student (CCP) or Post-Doc Researcher (ACCA, JGCR and FMFC) in the field of infectious diseases. The FIOCRUZ extramural coworkers contributed with critical overview of the study design, volunteers' immunization and medical care, blood sample collection, blind sample handling and processing, data collection, statistical analysis and data interpretation.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors thank the program for technological development in tools for health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

Funding

The authors thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Bio-Manguinhos/FIOCRUZ; PROEP/CPqRR/FIOCRUZ; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Nacional de Imunizações (PNI) – Ministério da Saúde Brasil, FIOTEC, PDTIS, CAPES and Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) for financial support. ACCA and JGCR received financial support from CNPq MCTI/CNPq/Universal 14/2014 (ACCA - Grant # 444417/2014-1 and JGCR - Grant # 458134/2014-7). OAMF and ATC thank the CNPq for the fellowships (PQ).

References

- Masrah TP. Yellow fever as an update. *Lancet Infect Dis* 2001; 1:111-20. PMID:11871460. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0)
- Folasho JD, Collier CH, Masrah TP, Dunne WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ* 1981; 59: 895-900. PMID:6978196
- Masrah TP, Masrah ND, Miller JD, Edgopong S, Tamon D, Wu ZI, Qureshi F, Garg S, Altman JT, Dal Rio C, et al. The yellow fever vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol* 2009; 182:7919-30. PMID:19933869. <https://doi.org/10.1093/immunol/kfn093>
- Collaborative group for studies on yellow fever vaccines. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine* 2004; 22:6077-84. PMID:15596666. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.021>
- Gonzalez E, Vazquez S, Carreira E. Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 89:554-64. PMID:24062295. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0264>
- Cincher D, Thomson R, Kozak N, Argenteanu BR, Neuber J, Feld-Medina A, Moore JC, Miller RS, Dale DR, Carter G, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multicline and polyfunctional immune responses. *J Exp Med* 2009; 202:1019-31. PMID:19647648. <https://doi.org/10.1084/jem.20082282>
- Bassi MR, Kogejovic M, Saffonova MA, Fetzer C, Ruzmanova M, Najak K, Pissan B, Striffler A, Bass S, Christmann JF, Thomson BR, Cincher D. T cell coexpression of antibodies in protecting against yellow fever virus. *J Immunol* 2015; 194: 1161-53. PMID:25559816. <https://doi.org/10.1093/immunol/kfv065>
- Quinn TT, Farris SA, Lee EK, Cao W, Nakaya HJ, Tamon D, Pirani A, Gessert K, Tang J, Mansfield B, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 2008; 10:116-25. PMID:19029982. <https://doi.org/10.1038/ni1688>
- Masrah TP, Nichols R, Archambault WT, Moore J, Marchant R, Tian J, Shope RE, Thorne W, Schaefer R, Fehr J, et al. Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (ARUVAX and YF-VAX) in a phase III multicenter, double-blind clinical trial. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 533-41. PMID:12301987
- Mayanja E, Swanaganda A, Nigam P, Chakr R, Pirani H, Subramanian D, Chandran G, Larson B, Reppichski J, Graham BS, et al. Immune activation after cellular and humoral responses to yellow fever 17D vaccine. *J Clin Invest* 2014; 124(4):147-58
- WHO. 2008. WHO Expert Committee on Biological Standardization Requirements for yellow fever vaccine. In: *Biological Requirements for Biological Substances*. Geneva: WHO.
- Campbell-Sills SC, de Araujo-Ferreira LF, Leite-Silva M, Brites MA, Martins MA, Sobrinho-Avilar R, de Sá-Silva-Lopes D, Camacho LA, de Moraes M R, de Lencastre S, et al. 17DD and 17D-213/77 yellow fever vaccinees elicit a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. *PLoS One* 2012; 7(12): e49828. PMID:23251551. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049828>
- Martins MA, Silva ML, Martins AO, Pombal-Magalhães V, Elze-Santos SM, Ribeiro JA, Castro-Oliveira R, Honório A, Kozak EG, Teixeira-Cavallho A, et al. Activation/induction of adaptive immunity occurs simultaneously after 17DD yellow fever vaccine vaccination in this the key to prevent severe adverse reactions following immunization? *Clin Exp Immunol* 2007; 148:96-100. PMID:17109541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03317.x>
- Ruedas P, Khan N, Nakaya HJ, Li S, Ledford-Smith J, Madico MS, Noll Y, Jones TP, Chapman T, Tamon J, et al. Vaccine activation of the invariant chain (IC2) in dendritic cells enhances antigen presentation. *Science* 2014; 343:313-7. PMID:24310610. <https://doi.org/10.1126/science.1248429>
- Mackay LR, Stock AT, Ma JZ, Jones CM, Kott SJ, Mueller SN, Heath WR, Carlsson FR, Goldbach T. Long-lived splenic immunity by invariant chain memory T (TEM) cells in the absence of persistent local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:7817-22. PMID:22589047. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202380109>
- Tan WC, Jin HT, Wain EE, Pankova-Mitchener P, Wiatrak A, Ziliox MJ, McElrath MJ, Baruch AHA, Masrah B. Comparative analysis of human immunodeficiency virus-specific efficacy and memory CD8+ T cells induced by different adjuvant systems. *J Virol* 2013; 87(1):59-72. PMID:23175355. <https://doi.org/10.1128/JVI.120355-12>
- Yasuk K, Hachibayashi M, Ni Y, Iwata J, Parkkinen GN, Fisher BK, Bakkerus L. Live attenuated tubercle bacillus expressing HIV and FIV vaccine antigens replicate and elicit durable immune responses in thymic macrophages. *Immunology* 2013; 140:99. PMID:23809818
- Hatch GJ, Graham VA, Bentley KR, Trice JA, Dunne M, Taylor T, Parashar SG, Han SK, Strick K, Tzipori T, Bass T, Hahnou L, Johnson DE, McLauchlin G, Charwood M, Roberts ADS, Vipond J. Assessment of the protective effect of Inuvax and Acan2000 vaccines against aerosolized monkeypox virus in cynomolgus macaques. *J Virol* 2013; 87:789-15. PMID:23558452. <https://doi.org/10.1128/JVI.01481-12>
- Ledgerwood JR, Zepke R, Hu Z, Wu CJ, Chang L, Evans MH, Hensel CS, Star S, Ralle RT, Koop RA, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS. Prime-boost strategy in a randomized phase 1 study to identify the minimum interval necessary to observe the 103 L85A influenza vaccine priming effect. *J Infect Dis* 2013; 208(18-22). PMID:23451407. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit380>
- Khanova S, Wu J, Dunstons M, King DR, Mutsaers J, Graham BS, Ledgerwood JR, Gidding H. DNA priming prior to inactivated influenza A(H5N1) vaccination upsets the antibody epitope repertoire and human affinity maturation in a boost-interval-dependent manner in adults. *J Infect Dis* 2013; 208(11-7). PMID:23633484. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit378>
- Okada K, Matsuzaki J, Kobayashi N, Matsumoto A, Matsubayashi F, Miller A, Beck A, Morrison CL, Ritter G, Goshy D, et al. Efficacy of vaccination with recombinant vaccine and live-attenuated vaccine expressing NY-695N1 antigen in mouse cancer and melanoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:5797-802. PMID:22854498. <https://doi.org/10.1073/pnas.111288109>
- Campbell JI, Murphy KL, Kunkel EJ, Böhning CE, Soto D, Shan Z, Betsworth J, Grossberg SB, Viana MA, Goodman SB, et al. CD87 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 2001; 166:477-84. PMID:11149663. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.477>
- Santos M, Canache LAB, Tamamian AMV, Miranda EH, Capistrano ACB, Farias MS. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. *Biological* 2013; 48:779-804. PMID:24103457. <https://doi.org/10.1016/j.biolog.2012.09.005>
- Reinhardt B, Jaspert S, Nitschik M, Krenn C, L'Age-Solte J. Development of viraemia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *J Med Virol* 1998; 56: 159-67. PMID:9746678. <https://doi.org/10.1093/jid/56.2.159>
- Miller JD, van der Meer BG, Masrah ES, Chidwell JT, Abbott S, Mueppler D, Mansfield-Kuhn B, Miller JT, Edgopong S, Lahr S, et al. Human efficacy and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccine. *Immunology* 2008; 207:10-21. PMID:18458421. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.010>
- Camp-Saravali AC, Estroff P de A, Castro-de-Rain JG, Pombal-Magalhães V, Vilela-Saunders G, Queiroz PS, Maia M de S, Farias RIB, Canache LAB, Farias M de S, et al. Side-effects of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics compared. *BMC Infect Dis* 2014; 14:1-10
- Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RE. Age-dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(7):407. PMID:24157572. <https://doi.org/10.1038/nri3597>
- Pombal-Magalhães V, Martins-Elba CA, Farias A, Silva L de A, Ribeiro A, Teixeira-Cavallho A, Espinosa RM, Guimarães-Cavallho SF, Ferraz TC, Van Wijnenburgh J, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by unbalanced ratio of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of memory T helper 1 (Th1) responses are hallmarks of active human chronic Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 2006; 146: 126-32. PMID:16984887. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03171.x>
- Silva ML, Martins MA, Espinoza-Santos LR, Camp-Saravali AC, Siqueira-Lemos JI, Ribeiro JG, Honório A, Kozak EG, Teixeira-Cavallho A, Elze-Santos SM, et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine* 2011; 29:545-52. PMID:20732645. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.046>

Anexo 3- Artigo Científico Submetido

O arquivo apresentado a seguir corresponde à primeira página do PDF gerado pela revista *Antiviral Research* em que foi submetido o artigo científico. Este manuscrito atribui-se aos objetivos específicos 3 e 4:

3. Identificar biomarcadores fenotípicos e funcionais da memória imunológica celular, induzidos *in vitro* pelo antígeno amarelo vacinal 17DD em cultura de células mononucleares do sangue periférico de adultos primovacinados, em diferentes tempos pós-vacinação, empregando a análise comparativa da assinatura ascendente de biomarcadores de memória;

4. Selecionar os melhores biomarcadores fenotípicos / funcionais para monitorar a memória imunológica após a vacinação primária anti-amarela (17DD), empregando ferramentas de biologia de sistemas.

Manuscript Details

Manuscript number	AVR_2017_114
Title	Systems biology-based approaches to evaluate the timing of memory status after 17DD-YF-primary vaccination
Article type	Research paper

Abstract

In this study, machine-enhanced techniques were applied to bring about scientific insights to identify a minimum set of phenotypic and functional (P&F) memory-related biomarkers for post-vaccination follow-up upon yellow fever (YF) vaccination. For this purpose, memory status of circulating T-cells (Naive/early-effector/Central-Memory/Effector-Memory) and B-cells (Naive/non-Classical-Memory/Classical-Memory) along with the cytokine profile (IFN/TNF/IL-5/IL-10) were monitored before-NV(day0) and at distinct time-points after 17DD-YF primary vaccination - PV(day30-45); PV(year1-9) and PV(year10-11). A set of P&F biomarkers (eEfCD4; EMCD4; CMCD19; EMCD8; IFNCD4; IL-5CD8; TNFCD4; IFNCD8; TNFCD8; IL-5CD19; IL-5CD4) were observed in PV(day30-45), but not in NV(day0), with most of them still observed in PV(year1-9). Deficiencies of P&F biomarkers were observed in NV(day0), while total lack of memory-related attributes was observed in PV(year10-11), regardless of the age at primary vaccination. Venn-diagram analysis pre-selected 10 attributes (eEfCD4, EMCD4, CMCD19, EMCD8, IFNCD4, IL-5CD8, TNFCD4, IFNCD8, TNFCD8 and IL-5CD4), of which the overall mean presented moderate accuracy to discriminate PV(day30-45)&PV(year1-9) from NV(day0)&PV(year10-11). High-dimensional data handling, starting from comprehensive decision-tree algorithms, defined EMCD8 and IL-5CD4 as the top-two predictors with moderated performance. Together with the PRNT titers, the top-two biomarkers led to a resultant memory status observed in 80% and 51% of volunteers in PV(day30-45) and PV(year1-9), contrasting with 0% and 29% found in NV(day0) and PV(year10-11), respectively. The conspicuous decrease of resultant memory along with the complete lack of memory-related attributes found in 22% volunteer from PV(year10-11) suggest that a booster dose of 17DD-YF vaccine is needed after primary vaccination to maintain protection in areas under risk of YF transmission.

Keywords	Biomarkers; Cell immunology; PRNT; Vaccinology; Yellow Fever
Manuscript category	Dengue and other flaviviruses
Manuscript region of origin	South America
Corresponding Author	Ana Campi-Azevedo
Order of Authors	Christiane Costa-Pereira, Ana Campi-Azevedo, Jordana Graziela Coelho-dos-Reis, Vanessa Peruhype-Magalhães, Márcio Araújo, Lis Ribeiro do Vale Antonelli, CRISTINA Fonseca, Jandira Aparecida Lemos, Luiz Cosme Malaquias, Matheus de Souza Gomes, Laurence Amaral, Maria Rios, Caren Chancey, Harold Richard Persi, Jorge Marcelo Pereira, Maria de Lourdes de Sousa Maia, Marcos da Silva Freire, Reinaldo de Menezes Martins, Akira Homma, Marisol Simões, Anna Yoshida Yamamura, Roberto Henrique Guedes Farias, Alessandro Pecego Martins Romano, Carla Domingues, Pedro Luiz Taui, Pedro Fernando Costa Vasconcelos, Iramaya Rodrigues Caldas, Luiz Antônio Camacho, Andréa Teixeira-Carvalho, Olindo Assis Martins-Filho, Collaborative Group for Studies of Yellow Fever

