

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA MULTIPARAMÉTRICA DE BIOMARCADORES
FENOTÍPICOS E FUNCIONAIS DA IMUNIDADE VACINAL ANTIAMARÍLICA 17DD**

por
Laise Rodrigues Reis

Belo Horizonte
2022

TESE

DCS – IRR L. R. REIS

2022

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740/00

R277a
2022

Reis, Laise Rodrigues.

Análise Exploratória Multiparamétrica de Biomarcadores Fenotípicos e Funcionais da Imunidade Vacinal Antiamarílica 17DD / Laise Rodrigues Reis – Belo Horizonte, 2022

XVI, 111 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 87-99

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do Título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecto-parasitárias e Crônicas não transmissíveis / DIP-DCNT

1. Febre Amarela 2. Desenvolvimento de Vacinas 3. anticorpos neutralizantes. 4. Biomarcadores. I. Título. II. Martins-Filho, Olindo Assis (Orientador)

CDD – 22. ed. – 616.93

LAISE RODRIGUES REIS

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA MULTIPARAMÉTRICA DE BIOMARCADORES
FENOTÍPICOS E FUNCIONAIS DA IMUNIDADE VACINAL ANTIAMARÍLICA 17DD**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis/ DIP-DCNT

Orientação: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Banca Examinadora:

Dr. Olindo Assis Martins Filho (IRR – FIOCRUZ/ MG) Orientador/Presidente

Dr^a. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz (IRR – FIOCRUZ/ MG) Titular

Dr^a. Sandra Grossi Gava (IRR – FIOCRUZ/ MG) Titular

Dr. Gregório Guilherme Almeida (IRR – FIOCRUZ/ MG) Titular

Dr^a. Maria Luiza Silva (UFMG/Hospital das Clínicas) Titular

Dr^a. Josiane da Silva Quetz (UNIFENAS BH) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 02 de junho de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me iluminar, acalmar meu coração diante das dificuldades e por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir. “Devemos tudo Àquele que nos deu sabedoria para descobrirmos nossa vocação e força para superarmos os obstáculos, tornando um sonho realidade”. Obrigada, Senhor!

Ao meu orientador, Dr. Olindo Assis Martins Filho, pela oportunidade, confiança, conselhos, ensinamentos e auxílio em cada passo, que foram fundamentais para o meu crescimento e amadurecimento profissional. Obrigado por tanto conhecimento transmitido. Muito orgulho de ter sido orientada por um profissional tão brilhante! Obrigada por tudo!

À Dra. Andréa Teixeira, pela oportunidade e por acreditar no meu potencial desde o início. Sou muito grata pelo apoio, conselhos, ensinamentos e por todo esforço e auxílio para que fosse possível a realização do meu doutorado sanduíche. Sempre muito solícita e com sugestões muito enriquecedoras. Agradeço imensamente por fazer parte da minha formação e por ter me ensinado tanto!

À Dra. Ana Carolina Campi, sempre presente e solícita para ajudar no que fosse necessário. Obrigada por todo suporte, orientação e ensinamentos em Imunologia, Citometria e Febre Amarela. Agradeço por sempre me auxiliar e ser sempre meu apoio!

Ao Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB), que equipe! Nada disso seria possível sem a ajuda e colaboração do grupo. Foi um prazer fazer parte de um grupo de pesquisa tão colaborativo e de poder trabalhar ao lado pessoas tão maravilhosas que fazem o trabalho ser leve e prazeroso. O GIPB vai estar sempre no meu coração!

Ao meu supervisor da Stanford University, Holden Maecker, por ter aberto as portas do laboratório e por ter me recebido tão bem. Agradeço por todo empenho para que fosse possível a realização do meu doutorado sanduíche, mesmo diante de tantas adversidades no ano de 2020. Não poderia deixar de agradecer também a todo seu

grupo de pesquisa por todo auxílio e colaboração, em especial a Dra. Caroline Duault e Yael Rosenberg-Hasson por todo treinamento, ensinamento e por sempre estarem disponíveis para ajudar.

Aos meus queridos e amados pais Lázaro e Marlene, por todo amor, apoio, dedicação e por não medirem esforços para a realização dos meus objetivos e sonhos. O meu muito obrigada é pequeno diante da grandeza que fizeram e fazem por mim. Como sou abençoada por tê-los como meus pais!

Ao meu esposo Gabriel Costa, por ser meu porto seguro. Agradeço o apoio, carinho, amizade, compreensão, dedicação, paciência e amor. E principalmente por ter aceitado um ano de distância para que tudo isso fosse possível! Obrigada por abraçar sonhos e objetivos junto comigo!

Aos meus amigos científicos e da vida, Jordana Fradico, Ismael Artur, Bruna Diniz e Thalles Lopes, pelos bons momentos e experimentos juntos, deixando tudo muito mais leve. Obrigado por me ensinarem tanto e por toda amizade!

Um obrigado especial à Jucélia Amorim (Juju), por ser essa pessoa sempre tão alegre e solícita! Obrigada por todo auxílio na logística dos projetos e por sempre ajudar com um sorriso no rosto. Você é demais, Juju! Obrigada!

Às queridas Christiane Costa, Dayane Otta e ao querido Ismael Artur pelo apoio incondicional na realização dos experimentos.

Ao apoio técnico do GIPB e a Plataforma de Citometria de Fluxo, pelo suporte, carinho e competência.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou pela oportunidade.

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa Nacional de Imunizações, Ministério da Saúde do Brasil,

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelo apoio financeiro.

Ao Programa Institucional de Internacionalização (CAPES – PrInt) pela oportunidade e apoio financeiro durante o período de doutorado sanduíche na Stanford University.

Aos meus grandes amigos Lucas Penido, Vanessa e Carla, por todos esses anos de amizade, conselhos e por estarem ao meu lado em todos os momentos, sejam alegres ou tristes. Vocês me ensinaram o significado e o valor de uma amizade verdadeira!

À toda minha família, por todas as orações, mensagens positivas e de motivação. Vocês são a minha base!

À todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A Febre Amarela (FA) é uma grande ameaça à saúde global, podendo ocorrer surtos de grande impacto na saúde pública. Por não possuir um tratamento específico, a vacinação é a principal medida de controle e prevenção. Este estudo avaliou o impacto da imunidade prévia para Flavivírus e a influência da idade na resposta imune específica para FA em indivíduos primovacinados com a dose padrão da vacina 17DD. Além disso, também incluiu a caracterização do perfil de anticorpos neutralizantes, de mediadores solúveis e de biomarcadores fenotípicos e funcionais em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina 17DD. Os resultados demonstraram taxas de soropositividade mais altas para FA, DENGUE e ZIKA em adultos em comparação com as crianças (26%;87%;67% vs 6%;13%;15%, respectivamente). Além disso, a soropositividade prévia para Flavivírus (DENGUE;ZIKA) não impactou na resposta imune celular específica para FA na linha de base do estudo. Entretanto, níveis mais elevados de NCD4, EMCD8, IFN-MCD8, NCD19 e nCMCD19 foram observados em indivíduos com soropositividade pré-existente para FA. Também foi observado que a primovacinação para FA induz um aumento dos níveis de anticorpos neutralizantes para FA no D30-45 com uma redução no D365 independentemente da faixa etária. Embora as taxas de soropositividade tenham sido semelhantes entre crianças e adultos no D30-45, taxas mais baixas foram observadas em crianças (9^{Meses}-2^{Anos}) no D365 (94%;95%;100% vs 87%;96%;99%). Além disso, um aumento de EMCD8 foi observado em todos os subgrupos no D30-45, entretanto uma redução no D365 foi relatada apenas em crianças (9^{Meses}-2^{Anos}). A assinatura de biomarcadores também demonstrou que apenas crianças (9^{Meses}-2^{Anos}) apresentam um declínio progressivo de EMCD8 no D365. Dessa forma, os resultados demonstraram que, independentemente das semelhanças observadas nos anticorpos neutralizantes para FA, a idade afeta a duração da resposta imune celular específica induzida pela primovacinação anti-amarela 17DD. Em relação ao perfil de anticorpos neutralizantes em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina 17DD, os resultados demonstraram um aumento da taxa de soropositividade no D30-45 em comparação com o D0 (0%;92%, respectivamente). Além disso, a primovacinação com a dose fracionada da vacina anti-amarela 17DD induz um perfil misto e polifuncional de produção de mediadores solúveis. Também foi observado um aumento de células TCD4⁺ e TCD8⁺ Efetoras Terminais (CD45RA⁺CCR7⁻), bem como

células B de Memória Não Clássica (IgD⁺CD27⁺) após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD. Em conjunto, os resultados fornecem evidências científicas positivas sobre a resposta imune induzida pela dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD e contribuem para o suporte do uso da estratégia em situações emergenciais.

Palavras-chave: Febre Amarela; resposta vacinal; vacina antiamarílica 17DD; memória celular; anticorpos neutralizantes; biomarcadores.

ABSTRACT

Yellow Fever (YF) is one of the greatest challenges to global health, and outbreaks can occur with a great impact on public health. As it does not have a specific treatment for the disease, vaccination is the main control and prevention measure. This is an study that evaluated the impact of previous Flavivirus serological status and the influence of age on the YF-specific immune response in individuals primary vaccinated with the standard dose of 17DD vaccine. In addition, it also included the characterization of the profile of neutralizing antibodies, soluble mediators and phenotypic and functional biomarkers in adults undergoing primary vaccination with a fractional dose of the 17DD vaccine. Data demonstrated higher seropositivity rates for YF, DENV and ZIKV in adults compared to children (26%;87%;67% vs 6%;13%;15%, respectively). Moreover, the heterologous flavivirus seropositivity (DENV;ZIKV) did not impact the YF-specific cellular immune response at baseline. However, higher levels of NCD4, EMCD8, IFN-MCD8, NCD19 and nCMCD19 were observed in subjects with pre-existing YFV seropositivity. It was also observed that primary vaccination for YF induces an increase in YF neutralizing antibody levels at D30-45 with a reduction at D365 regardless of age subgroup. Although similar seropositivity rates observed amongst children and adults at D30-45, lower rates were observed in children (9^{Months-2Years}) at D365 (94%;95%;100% vs 87%;96%;99%). Furthermore, an increase in EMCD8 was observed in all subgroups at D30-45, however a reduction in D365 was reported only in children (9^{Months-2Years}). The signature of biomarkers also demonstrated that only children (9^{Months-2Years}) show a progressive decline in EMCD8 at D365. Together these findings demonstrated that regardless the similarities observed in YF-neutralizing antibodies, the age impacts the duration of cellular response to primary 17DD-YF vaccination. Regarding the profile of neutralizing antibodies in adults submitted to primary vaccination with fractional dose of the YF-17DD vaccine, the results showed an increase in the rate of seropositivity in D30-45 compared to D0 (0%;92%, respectively). Furthermore, the primary vaccination with a fractional dose of 17DD-YF vaccine induces a mixed and polyfunctional profile of soluble mediator production. An increase in TCD4⁺ and TCD8⁺ Terminal Effector cells (CD45RA+CCR7⁻) as well as Non-Classical Memory B cells (IgD+CD27⁺) was also observed after primary vaccination with the fractional dose of 17DD-YF vaccine. Together, the results provide positive scientific evidence about the immune response

induced by fractional dose of the 17DD vaccine and contributes to support the use of the strategy in emergency situation.

Keywords: Yellow Fever; vaccine response; 17DD yellow fever vaccine; cellular memory; neutralizing antibodies; biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização do genoma do vírus da Febre Amarela.....	18
Figura 2 – Ciclos de transmissão do vírus da Febre Amarela.....	20
Figura 3 – Distribuição de casos humanos de FA silvestre na Região Amazônica e Extra-Amazônica no período de 1998 a 2020.....	22
Figura 4 – Resposta imune celular induzida pela vacina de Febre Amarela.....	27
Figura 5 – Fluxograma da população de estudo, desenho e métodos referente aos objetivos específicos 1 e 2.....	34
Figura 6 – Fluxograma da população de estudo, desenho e métodos referente aos objetivos específicos 3 e 4.....	35
Figura 7 – Esquema do protocolo de execução do teste μ PRN-HRP de FA.....	39
Figura 8 – Estratégia de análise para avaliação de Linfócitos T de memória.....	46
Figura 9 – Estratégia de análise para avaliação de Linfócitos B de memória.....	48
Figura 10 – Estratégia de análise para avaliação de biomarcadores fenotípicos e funcionais antígeno-específica para FA por citometria de massa (CyTOF).....	51
Figura 11 – Sorologia para Flavivírus na linha de base do estudo.....	55
Figura 12 – Sorologia para Flavivírus e resposta celular específica para FA na linha de base do estudo.....	57
Figura 13 – Influência da idade na produção de anticorpos neutralizantes para FA após a primovacinação antiamarílica 17DD.....	59
Figura 14 – Influência da idade nos biomarcadores fenotípicos de células T de memória antígeno-específica para FA após a primovacinação antiamarílica 17DD.....	61
Figura 15 – Influência da idade nos biomarcadores fenotípicos de células B de memória antígeno-específica para FA após a primovacinação antiamarílica 17DD.....	62
Figura 16 – Assinatura ascendente de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica após a primovacinação antiamarílica 17DD.....	64
Figura 17 – Biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória para FA comuns e seletivos observados após a primovacinação antiamarílica 17DD.....	66

Figura 18 – Perfil de anticorpos neutralizantes para FA após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.....	67
Figura 19 – Análise de mediadores solúveis de soro em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.....	69
Figura 20 – Perfil de mediadores solúveis de soro em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.....	71
Figura 21 – Mapeamento de redes de mediadores solúveis em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.....	73
Figura 22 – Cinética e assinatura de mediadores solúveis de sobrenadante de cultura antígeno-específica para FA.....	75
Figura 23 – Características fenotípicas da resposta celular antígeno-específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.....	76
Figura 24 – Resposta de memória específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.....	77
Figura 25 – Análise por tSNE da resposta de memória específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.....	78
Figura 26 – Perfil funcional da resposta celular específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.....	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µPRN-HRP – do inglês *Micro Plaque Reduction Neutralization – Horseradish Peroxidase*

mL – Mililitro

17DD – Cepa 17DD do vírus da Febre Amarela

ACC – Aceleração

APC – Aloficocianina (do inglês *Allophycocyanin*)

BSA – Albumina Sérica Bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

CC – Cultura controle

CD – do inglês *Cluster of Differentiation*

CE – Cultura estimulada

CG – Controle de *gate*

CM – Memória central (linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺) (do inglês *Central Memory*) e memória clássica (linfócitos B) (do inglês *Classical Memory*)

CMC – Carboximetilcelulose

CO₂ – Dióxido de Carbono

Cy – Cianina (do inglês *Cyanine*)

CyTOF – do inglês *Cytometry by Time-Of-Flight*

DCC – Desaceleração

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPBS – do inglês *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*

D0 – Dia 0

D2 – Dia 2

D4 – Dia 4

D6 – Dia 6

D30-45 – Dia 30-45

D365 – Dia 365

eA – do inglês *early activated* (linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺)

eEf – do inglês *early effector* (linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺)

ELISA – do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EM – Memória efetora (linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺) (do inglês *effector memory*)

EUA – Estados Unidos da América

EYE – do inglês *Eliminate Yellow Fever Epidemics Strategy*

FA – Febre Amarela

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FITC – Isotiocianato de fluoresceína (do inglês *Fluorescein isothiocyanate*)

FSC-A – Dispersão frontal por área (do inglês *Forward scatter – 28rea*)

FSC-H – Dispersão frontal por altura (do inglês *Forward scatter – heigth*)

GAVI – do inglês *Global Alliance for Vaccines and Immunization*

HES – Hidroxietilamido

HIMC – do inglês *The Human Immune Monitoring Center*

HRP – do inglês *Horseradish Peroxidase*

IFN-M – Memória mediada por interferon (linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺) (do inglês *interferon-mediated memory*)

IMF – Intensidade Média de Fluorescência

Ig – Imunoglobulina

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

LATEV/BIO – Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos

LB – Linfócitos B

LT – Linfócitos T

N – *naïve* (linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B)

n – Número amostral

nIFN-M – Memória não mediada por interferon (linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺) (do inglês *non-interferon mediated memory*)

NS – não estrutural

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão Salina Fosfato (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PE – Ficoeritrina (do inglês *phycoerythrin*)

PFA – Paraformaldeído

PFU – Unidades formadoras de placas (do inglês *Plaque Formation Units*)

PerCP – do inglês *Peridinin Chlorophyll Protein complex*

PHA – Fitohemaglutinina (do inglês *phytohaemagglutinin*)

PNI/MS – Programa Nacional de Imunizações/Ministério da Saúde

Qdot – do inglês, *Quantum Dots Technology*

Rpm – Rotações por minuto

RPMI – Meio de cultura RPMI (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*)

SAGE – do inglês *Strategic Advisory Group of Experts*

SSC – Dispersão lateral (do inglês *Side scatter*)

T0 – tempo 0

T2 – tempo 2

T4 – tempo 4

T6 – tempo 6

TB – do inglês *True Blue*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TLR – Receptores do tipo “*Toll-like*”

TMG – Título médio geométrico

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor – α*)

UBS – Unidade Básica de Saúde

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância

WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Aspectos Gerais da Febre Amarela.....	17
1.2 Ciclos de Transmissão.....	19
1.3 Epidemiologia.....	20
1.4 Controle e Prevenção.....	23
1.5 Vacina da Febre Amarela.....	24
1.5.1 Recomendação vacinal no Brasil.....	24
1.5.2 Eficácia e imunogenicidade.....	25
1.5.3 Resposta imune à vacina antiamarílica.....	26
1.5.4 Dose fracionada da vacina antiamarílica.....	29
2 JUSTIFICATIVA.....	31
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 População de estudo.....	33
4.2 Critérios de elegibilidade.....	36
4.2.1 Critérios de inclusão.....	36
4.2.2 Critérios de exclusão.....	37
4.3 Procedimentos laboratoriais.....	37
4.3.1 Titulação de anticorpos neutralizantes (μ PRN-HRP)	37
4.3.2 Determinação de IgG para DENGUE.....	39
4.3.3 Determinação de IgG para ZIKA.....	40
4.3.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a partir de coágulo sanguíneo.....	40
4.3.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a partir de sangue heparinizado.....	41
4.3.6 Protocolo de descongelamento de PBMC.....	42
4.3.7 Cultura celular <i>in vitro</i> antígeno-específico para FA de longa duração..	42
4.3.8 Análise de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA por citometria de fluxo.....	43

4.3.9 Análise de biomarcadores fenotípicos e funcionais antígeno-específica para FA por citometria de massa (CyTOF).....	49
4.3.10 Análise de mediadores solúveis em amostras de soro e sobrenadante de cultura por Luminex.....	52
4.4 Análise dos dados.....	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Impacto da imunidade prévia para Flavivírus (FA, DENGUE e ZIKA) na resposta celular específica para FA em indivíduos residentes em áreas sem circulação do vírus amarelo após a vacinação com a dose padrão da vacina 17DD.....	55
5.1.1 Status sorológico para Flavivírus (FA, DENGUE e ZIKA) na linha de base do estudo.....	55
5.1.2 Impacto do status sorológico prévio para Flavivírus na resposta celular específica para FA após vacinação anti-amarela 17DD.....	56
5.2 Influência da idade na produção de anticorpos neutralizantes e biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA em indivíduos residentes em áreas sem circulação do vírus amarelo após a primovacinação com a dose padrão da vacina 17DD.....	58
5.2.1 Análise da produção de anticorpos neutralizantes para FA.....	58
5.2.2 Análise de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA.....	60
5.2.3 Influência da idade na assinatura de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA.....	63
5.2.4 Biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA comuns e seletivos em crianças e adultos.....	65
5.3 Perfil de anticorpos neutralizantes e mediadores solúveis em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina anti-amarela 17DD.....	67
5.3.1 Análise da produção de anticorpos neutralizantes para FA.....	67
5.3.2 Análise de mediadores solúveis em amostras de soro.....	68
5.3.3 Análise de mediadores solúveis em amostras de sobrenadante de cultura.....	74

5.4 Perfil de biomarcadores fenotípicos e funcionais em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.....	76
6 DISCUSSÃO.....	81
7 CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICE.....	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Febre Amarela

A Febre Amarela (FA) é uma doença infecciosa febril aguda, não contagiosa e transmitida exclusivamente pela picada de vetores artrópodes hematófagos do gênero *Haemagogus*, *Sabethes* e *Aedes* (DOUAM; PLOSS, 2018; MONATH; VASCONCELOS, 2015). A FA pode se manifestar de diferentes formas clínicas, variando desde uma infecção assintomática até a sua forma grave, caracterizada por febre hemorrágica de alta letalidade (JOHANSSON; VASCONCELOS; STAPLES, 2014; MONATH; VASCONCELOS, 2015). A forma assintomática e/ou leve é a forma clínica mais frequente, responsável por aproximadamente 90% dos casos e caracterizada por febre, náusea, vômito, artralgia e mialgia. As características dessas formas clínicas podem ser facilmente confundidas com outras doenças infecciosas comuns em áreas endêmicas, sendo, portanto, de difícil diagnóstico (BRASIL, 2017; VASCONCELOS, 2003; WAGGONER; ROJAS; PINSKY, 2018). Apenas 10% dos casos desenvolvem a forma grave da doença, definida por hemorragia, icterícia, falência hepato-renal e relacionada à alta letalidade (BRASIL, 2017; VASCONCELOS, 2003). Além disso, um novo padrão clínico da forma grave da doença vem sendo observado em indivíduos hospitalizados, caracterizado por eventos de hepatite tardia associada a danos cardíacos, renais e pancreáticos, hematofagocitose, aumento de transaminases, alta carga viral circulante, sepsia, dentre outros (DUARTE-NETO et al., 2019; KALLAS et al., 2019; REZENDE et al., 2020; WILDER-SMITH et al., 2019).

A FA é causada por um arbovírus, protótipo do gênero *Flavivirus*, da família Flaviviridae, que contém aproximadamente 70 vírus distintos (BARRETT; HIGGS, 2007; MONATH, 2001; MONATH; VASCONCELOS, 2015). São vírus de RNA de fita simples e sentido positivo, envelopados, esféricos e com um genoma de cerca de 11.000 nucleotídeos. A partir de uma fase de leitura aberta de cerca de 10.000 nucleotídeos, uma única poliproteína, com cerca de 3.400 aminoácidos, é traduzida e então processada em dez proteínas virais: três proteínas estruturais (C, PrM e E) e sete proteínas não estruturais (NS) (NS1, NS2A-2B, NS3, NS4A-B e NS5) (DOUAM; PLOSS, 2018; MONATH, 2001) (Figura 1). Além disso, existem duas regiões não codificantes as quais são responsáveis pela regulação e expressão viral, como replicação, virulência e patogenicidade (MONATH, 2001).

Figura 1 – Organização do genoma do vírus da Febre Amarela

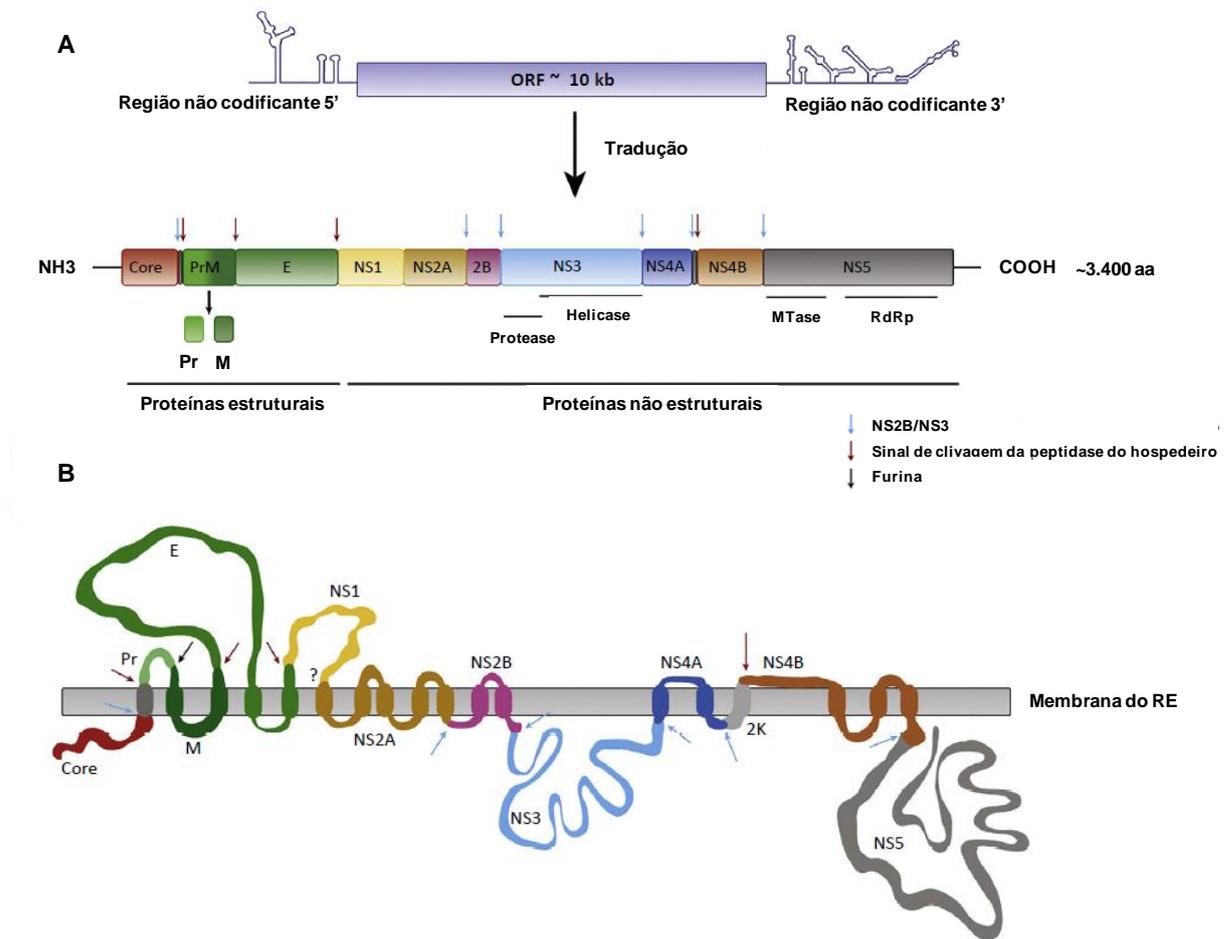


Figura 1 – Organização do genoma do vírus da Febre Amarela. (A) Representação do RNA de fita simples e da poliproteína viral, com cerca de 3.400 aminoácidos. As setas indicam os locais de clivagem na poliproteína, que é processada por proteases. Cada proteína viral está representada por uma cor. (B) Representação da poliproteína ancorada na membrana do retículo endoplasmático (RE). FONTE: DOUAM e PLOSS, 2018 (Adaptado).

As proteínas estruturais C, PrM e E são as precursoras da proteína do capsídeo (C), da membrana (M) e do envelope (E) viral. Além disso, elas também possuem um papel fundamental na ativação da resposta imunológica do hospedeiro durante a infecção (BURKE; MONATH, 2001; DOUAM; PLOSS, 2018; GARDNER; RYMAN, 2010). As proteínas não estruturais estão associadas com o processo de replicação do vírus e montagem de novas partículas virais (DOUAM; PLOSS, 2018; JONKER; VISSER; ROUKENS, 2013; MURRAY; JONES; RICE, 2009). A interação do vírus amarelo com a célula hospedeira ocorre por meio de receptores de superfície que contribuem para a internalização viral por endocitose. Uma vez dentro da célula do

hospedeiro, o pH baixo do endossomo contribui para a fusão do envelope viral com a membrana endossômica e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula. Após a desmontagem do nucleocapsídeo, a replicação prossegue para a tradução imediata das proteínas virais (BRESSANELLI et al., 2004; GARDNER; RYMAN, 2010).

1.2 Ciclos de Transmissão

São descritos dois ciclos básicos de transmissão da FA: o ciclo silvestre, o qual o vírus se mantém em hospedeiros vertebrados suscetíveis, principalmente em primatas não humanos; e o ciclo urbano. Além desses dois ciclos clássicos de transmissão, tem sido relatada no continente africano, a introdução de um ciclo intermediário provocada por mosquitos do gênero *Aedes* (BARRETT; HIGGS, 2007; COUTO-LIMA et al., 2017; MONATH; VASCONCELOS, 2015) (Figura 2).

O ciclo silvestre ocorre em florestas tropicais e os primatas não humanos são os principais hospedeiros do vírus da FA. Além deles, outros mamíferos, como os marsupiais e alguns roedores, também são suscetíveis à doença e possíveis reservatórios (BARRETT; HIGGS, 2007). A participação dos humanos nesse ciclo ocorre como hospedeiros acidentais, quando indivíduos não imunizados ou imunizados que perderam correlatos de proteção antiamarílica, adentram no ciclo enzoótico natural por motivos ocupacionais ou de lazer. Nesse sentido, a infecção é mais frequente em indivíduos do sexo masculino, com idade economicamente ativa e que trabalham próximos ou em regiões rurais. Na América Central e do Sul, a transmissão ocorre através da picada de mosquitos hematófagos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*. Já na África, o principal mosquito transmissor é do gênero *Aedes*. Além disso, em algumas regiões secas da África, o vírus também foi isolado de carrapatos *Amblyoma variegatum*, podendo indicar um possível papel desses artrópodes na transmissão da doença (MONATH, 2001; VASCONCELOS, 2003).

No ciclo urbano, o único hospedeiro é o homem e a transmissão ocorre quando pessoas infectadas com o vírus amarelo se adentram em áreas densamente povoadas e com um elevado número de indivíduos não imunizados. Nesse ciclo, o principal mosquito responsável pela transmissão pertence ao gênero *Aedes* (DOUAM; PLOSS, 2018; MONATH; VASCONCELOS, 2015; VASCONCELOS, 2003). No Brasil, não há registros da presença do ciclo urbano desde o ano de 1942. No entanto, intensos surtos urbanos de FA são registrados na África, principalmente na República

Democrática do Congo, Angola, Uganda e Nigéria (BARRETT; HIGGS, 2007; CAVALCANTE; TAUIL, 2017).

O ciclo intermediário geralmente ocorre em áreas como vilarejos, terras agrícolas e comunais, podendo ocorrer infecção tanto em primatas não humanos quanto em humanos. Neste ciclo, a transmissão ocorre por meio de mosquitos semi-domésticos (que se reproduzem tanto em florestas quanto ao redor de domicílios) e é o ciclo mais frequente na África (MUTEBI; BARRETT, 2002; OPAS, 2021; WHO, 2021a).

Figura 2 – Ciclos de transmissão do vírus da Febre Amarela

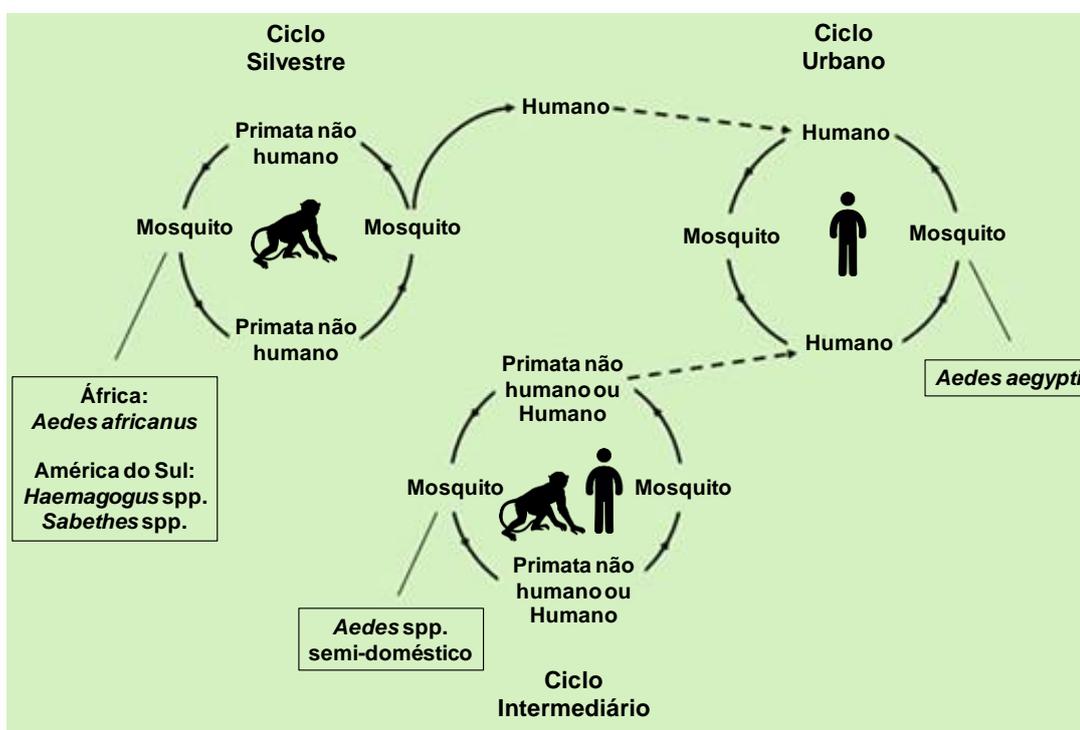


Figura 2 - Ciclos de transmissão do vírus da Febre Amarela. Estão representados no esquema os três ciclos de transmissão (silvestre, urbano e intermediário) da Febre Amarela, bem como os principais vetores e hospedeiros envolvidos em cada ciclo. FONTE: CDC; NCEZID; DVBD, 2019 (Adaptado).

1.3 Epidemiologia

A FA possui grande importância epidemiológica em função da sua gravidade clínica e elevado potencial de disseminação. A doença é endêmica em países da África, América Central e América do Sul, podendo ocorrer surtos ou epidemias de grande impacto na saúde pública. Cerca de 200.000 casos da doença são reportados anualmente com uma alta taxa de mortalidade, podendo variar de 20-50% nas formas graves (OPAS, 2021; WHO, 2021b). Além disso, tem-se observado um ressurgimento

significativo da doença nas últimas décadas, derivado de uma baixa cobertura vacinal, desmatamento, urbanização, mudanças climáticas e migração populacional (DORIGATTI et al., 2017; SHEARER et al., 2017; WHO, 2021a).

Entre os séculos XVIII e o início do século XX, a FA foi responsável por um grande número de mortes, com intensas epidemias urbanas na África e América do Sul e surtos locais na Europa, Caribe e América do Norte. Com a identificação do *Aedes aegypti* como vetor da doença no ano de 1900, iniciaram-se ações e programas de erradicação de vetores, bem como de saneamento básico que resultou em um declínio significativo da doença e erradicação da FA urbana na América do Norte e Europa (GARDNER; RYMAN; GENETICS, 2010; MONATH, 2006). Entretanto, a FA silvestre ainda está presente em países da África, América Central e do Sul com cerca de 900 milhões de pessoas sob risco de infecção (GARDNER; RYMAN; GENETICS, 2010; MONATH; VASCONCELOS, 2015). Além disso, também tem sido relatado o risco de reintrodução do ciclo urbano, uma vez que o *Aedes aegypti* permanece nos grandes centros urbanos (COUTO-LIMA et al., 2017; MONATH; VASCONCELOS, 2015; VASCONCELOS; MONATH, 2016). Sendo assim, a FA ainda é uma importante ameaça à saúde pública e com elevada capacidade epidêmica, sobretudo em áreas infestadas por *Aedes aegypti*, densamente povoadas e com baixa cobertura vacinal.

No Brasil, a FA silvestre é endêmica na Região Amazônica, porém também são registrados ocasionalmente períodos epizooticos e epidêmicos na Região Extra-Amazônica, representando reemergências da doença no país (BRASIL, 2014; DORIGATTI et al., 2017). O período de maior incidência de FA no Brasil ocorre entre os meses de dezembro a maio, os quais as condições como temperaturas mais elevadas, altos níveis pluviométricos e alta densidade de vetores, se tornam mais favoráveis para a transmissão (BRASIL, 2014; POSSAS et al., 2018; VASCONCELOS, 2001; VASCONCELOS; TRAVASSOS; TRAVASSOS, 2001). Entretanto, também há registros de transmissão fora desse período clássico, caracterizando uma periodicidade irregular (BRASIL, 2014; SVS; DEIDT, 2021).

Um ressurgimento da FA silvestre no Brasil vem sendo observado desde 2014, resultando, até junho de 2020, 2.283 casos humanos e 779 óbitos, com uma letalidade de 34,1% (Figura 3) e representando o maior surto de FA silvestre na história do país desde que o ciclo silvestre foi descrito na década de 1930. No total, 18 estados de todas as regiões do Brasil foram afetados, alcançando áreas de Mata Atlântica, onde as populações não estavam imunizadas. Além disso, casos humanos e/ou epizootias

também ocorreram em todos os estados das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país (BRASIL, 2014; DORIGATTI et al., 2017; SVS; DEIDT, 2021).

Figura 3 – Distribuição de casos humanos de FA silvestre na Região Amazônica e Extra-Amazônica no período de 1998 a 2020

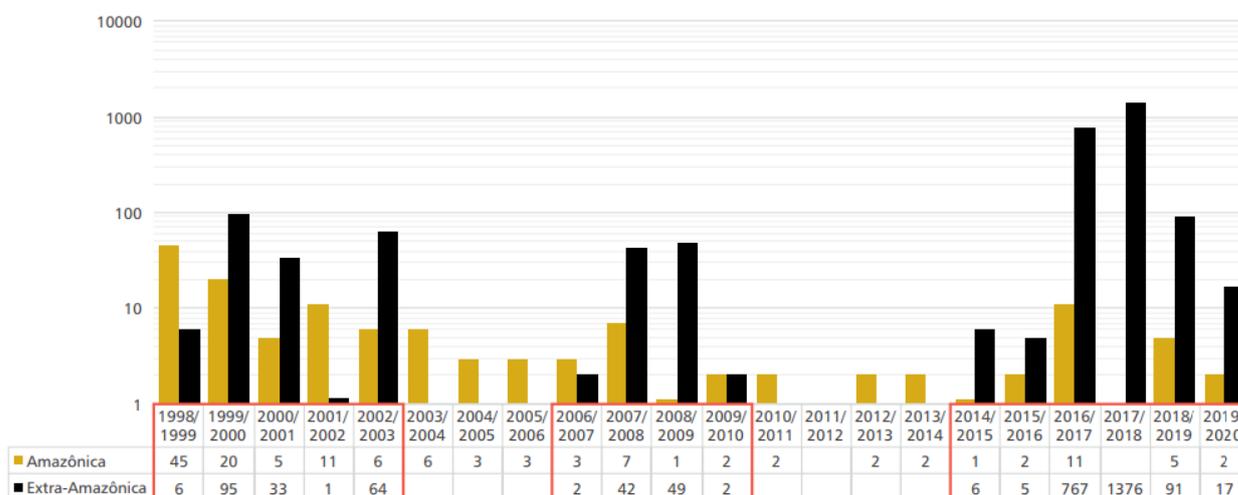


Figura 3 - Distribuição de casos humanos de FA silvestre na Região Amazônica e Extra-Amazônica no período de 1998 a 2020. As barras amarelas representam o número de casos reportados em cada ano na Região Amazônica e as pretas na Região Extra-amazônica. FONTE: SVS; DEIDT, 2021.

Entre julho de 2020 e junho de 2021, 8 casos e 3 óbitos por FA foram confirmados no estado de Santa Catarina entre indivíduos não vacinados. Atualmente, o estado conta com uma cobertura vacinal de 77%. Tem sido observada uma crescente disseminação da doença no sul do país, responsável por 78% dos casos suspeitos e 100% dos casos confirmados entre 2020 e 2021. Além disso, a pandemia de COVID-19 apresentou um desafio adicional para o controle da FA, com grandes impactos nos programas de vigilância, interrupção de campanhas e serviços de vacinação para a doença (WER, 2021).

Diante desses dados, pode-se observar que a FA continua com um elevado potencial de disseminação e com persistente risco de transmissão em áreas endêmicas, tornando as ações de prevenção e controle e a avaliação periódica das áreas de risco essenciais para um melhor manejo da doença.

1.4 Controle e Prevenção

Não existe nenhum tratamento específico para a FA, sendo, portanto, realizado apenas um tratamento sintomático, o qual inclui reposição de líquidos, uso de analgésicos e antipiréticos, repouso e observação da evolução clínica do paciente para um manejo clínico adequado conforme os sintomas relatados (ROLLINS; RAMSEY; PARSH, 2017).

A principal estratégia de controle e prevenção é através da vacinação. A Organização Mundial de Saúde (OMS) certifica e recomenda o uso de duas vacinas antiamarílicas originárias da amostra africana 17D, as subamostras 17D-204 e 17DD, sendo constituídas por vírus vivos atenuados, altamente imunogênicas e seguras. Não existem diferenças significativas quanto à segurança e imunogenicidade entre as vacinas 17D-204 e 17DD, com raros eventos adversos graves associados a elas (MONATH; VASCONCELOS, 2015). No Brasil, a vacina em uso é a 17DD, produzida por Bio-Manguinhos na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) desde 1937 (BIOMANGUINHOS, 2011; MONATH; VASCONCELOS, 2015).

A reemergência da FA a partir de 2008, principalmente na Região Extra-Amazonica, induziu a necessidade de revisão e adoção de novas estratégias de vigilância, prevenção e controle da doença. Nesse sentido, em julho de 2013 o Grupo Técnico Assessor da OMS realizou uma revisão do documento de imunização para a FA, que estava vigente desde 2003. A revisão incluiu assuntos relacionados à necessidade da dose de reforço da vacina a cada 10 anos e a segurança da vacina em indivíduos imunocomprometidos. Considerando a sobrecarga no abastecimento das vacinas de FA devido a crescente demanda e baseado em uma revisão sistemática de estudos publicados sobre a duração da imunidade após uma única dose da vacina de FA, a OMS concluiu que não havia necessidade de uma dose de reforço após 10 anos, implementando um novo Regulamento Sanitário Internacional em 2016 que determina que apenas uma única dose da vacina é suficiente para garantir proteção por toda a vida (PNI; DEVIT/SVS/MS, 2014; WHO, 2013).

Além da vacinação, algumas estratégias também vêm sendo adotadas para o controle da FA, tais como controle vetorial e proteção individual a partir do uso de repelentes e mosquiteiros. Entretanto, o combate aos vetores da FA silvestre é impraticável, sendo possível apenas o controle do vetor da FA urbana (*Aedes aegypti*),

que, juntamente com a vacinação, tornam-se os principais meios de prevenção da reurbanização da doença (VASCONCELOS, 2002).

Além disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e o *Global Alliance for Vaccines and Immunization* (GAVI) fundaram o programa *Eliminate Yellow Fever Epidemics Strategy* (EYE), cujos objetivos incluem proteger as populações em risco, prevenir a propagação internacional da doença e conter surtos rapidamente. O programa inclui, além da vacinação, estratégias como vigilância, controle vetorial, fortalecimento da capacidade laboratorial, desenvolvimento de planos de intervenção e envolvimento do setor privado, principalmente mineração, silvicultura e agroindústria. O objetivo principal é o diagnóstico precoce para que as medidas de controle possam ser aplicadas em tempo hábil e impedir uma possível epidemia da doença (WHO, 2021a).

1.5 Vacina da Febre Amarela

1.5.1 Recomendação vacinal no Brasil

A vacina antiamarílica encontra-se no calendário nacional de vacinação do Brasil e é de caráter obrigatório, devendo os serviços públicos de saúde ou médicos em exercício, fornecerem o comprovante de vacinação (BRASIL, 2004).

O Programa Nacional de Imunizações sofre constantes alterações que se baseiam na análise de estudos que avaliam a resposta imune induzida pela vacina antiamarílica, visando sempre à ampliação da cobertura vacinal e prevenção de futuros surtos da doença. Nesse sentido, em 2020 o Ministério da Saúde do Brasil decidiu ampliar a recomendação vacinal da FA para todo o território nacional, com ampliação de 1.101 municípios do Nordeste que ainda não faziam parte da área de recomendação. Além disso, também decidiu oferecer uma dose de reforço para crianças de 4 anos de idade (BVS, 2021).

Sendo assim, a atual recomendação da vacina de FA no Brasil consiste em: crianças, ao completarem 9 meses de idade, devem tomar uma dose; ao completarem 4 anos, devem tomar a dose de reforço; pessoas de 5 a 59 anos, devem tomar uma única dose, não havendo necessidade de uma dose de reforço. A vacina é contraindicada para crianças menores de 9 meses de idade, mulheres em

amamentação de crianças menores de 6 meses, pessoas com histórico de alergia grave ao ovo, pessoas imunocomprometidas, dentre outros (SVS, 2021).

1.5.2 Eficácia e imunogenicidade

As vacinas antiamarílicas disponíveis (17D-204 e 17DD) induzem altos níveis de anticorpos neutralizantes em adultos vacinados, variando de 95 a 99% entre 10 a 30 dias após a vacinação (CAMPI-AZEVEDO et al., 2016; COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACCINES, 2014; COSTA-PEREIRA et al., 2018; MONATH, 2001). A resposta primária por anticorpos neutralizantes é detectável 7 dias após a vacinação e é altamente específica. De acordo com o CDC, após a administração de cerca de 540 milhões de doses da vacina antiamarílica, apenas 23 falhas vacinais foram detectadas (CDC, 2015; STAPLES; GERSHMAN; FISCHER, 2002).

Estudos anteriores demonstraram que alguns fatores podem afetar as respostas induzidas pela vacina antiamarílica, como a idade na primovacinação, nutrição, genética, exposição à Flavivírus heterólogos, dentre outros (BIFANI; ONG; DE ALWIS, 2020; JEAN et al., 2016; MUYANJA et al., 2014). Em relação à idade, estudos demonstraram que as vacinas 17D-204 e 17DD de FA são altamente imunogênicas em adultos, induzindo uma soroconversão de quase 100% após a primovacinação (CAMACHO et al., 2004; HEPBURN et al., 2006; JEAN et al., 2016; MONATH et al., 2002). Entretanto, níveis mais baixos de anticorpos neutralizantes foram relatados em crianças de diferentes idades na primovacinação, variando de 77,5% a 90%. Em crianças com idade entre 9-11 meses, a soroconversão foi ainda mais baixa, atingindo taxas críticas de 72% (CAMACHO et al., 2015; GOTUZZO; YACTAYO; CÓRDOVA, 2013; GRUPO COLABORATIVO DO PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES PARA O ESTUDO DA SOROCONVERSÃO PELA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA, 2003; MONATH et al., 2012). Em relação à circulação do vírus de FA, foi demonstrado que as taxas de soroconversão em países não endêmicos são maiores do que em países endêmicos (98,9% vs 94,2%) (JEAN et al., 2016). Além disso, mudanças no microambiente imunológico também podem afetar a resposta quantitativa e qualitativa à vacina antiamarílica 17D (MUYANJA et al., 2014). Foi proposto que a exposição frequente a doenças infecciosas induz um microambiente imune constantemente ativado que pode levar a uma exaustão de células T. Esses

eventos podem afetar as respostas humoral e celular e reduzir a eficácia da vacina (MUYANJA et al., 2014).

1.5.3 Resposta imune à vacina antiamarílica

As vacinas antiamarílicas induzem uma resposta imune humoral rápida e específica. Após a primovacinação, há uma breve e baixa viremia (2-3 dias; <200 PFU/mL) que é observada em aproximadamente 50% dos indivíduos vacinados (BARRETT; TEUWEN, 2009). Logo após, há uma resposta primária à vacina por anticorpos IgM, os quais podem ser detectados entre o 3º e o 7º dia com um pico 2 semanas pós-vacinação, podendo ser detectáveis por até 3 meses (FERREIRA et al., 2018; MONATH, 1971). Entretanto, já foi demonstrado que a IgM pode ser detectada até 3-4 anos após a vacinação (GIBNEY et al., 2012).

Posteriormente, os anticorpos neutralizantes, em sua maioria IgG, passam a ser detectados. Os anticorpos neutralizantes possuem um papel importante de proteção, uma vez que sua principal função é bloquear a interação do vírus com a célula hospedeira, impedindo que as células-alvo sejam infectadas. Diante disso, eles são considerados o principal mecanismo de proteção específica para a FA, direcionados a diversos epítomos complexos encontrados na superfície viral (FERREIRA et al., 2018; PIERSON et al., 2008; VRATSKIKH et al., 2013). Eles podem persistir por anos no organismo, proporcionando proteção contra a doença caso o indivíduo seja exposto ao vírus (GOTUZZO; YACTAYO; CÓRDOVA, 2013).

Embora a participação dos anticorpos neutralizantes seja importante para conferir imunidade vacinal (ROUKENS et al., 2018; SIMÕES et al., 2012; VRATSKIKH et al., 2013), seu papel não é exclusivo, uma vez que diversos tipos celulares também estão envolvidos na proteção e manutenção da resposta à vacina (AKONDY et al., 2009; COSTA-PEREIRA et al., 2018; HOU et al., 2017; QUEREC; PULENDRAN, 2007). Tem sido demonstrado um papel importante da imunidade inata, responsável pelo controle inicial da infecção por FA (HOU et al., 2017; QUEREC; PULENDRAN, 2007). Epítomos endógenos e recombinantes são expressos em decorrência da capacidade do vírus de FA se replicar em células dendríticas e, conseqüentemente, diferentes tipos de receptores do tipo “*Toll-like*” (TLR), como TLR 2, 3, 7, 8 e 9 são estimulados (QUEREC; PULENDRAN, 2007). Devido a esse fenômeno, há produção de quimiocinas (CXCL10) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) que induzem uma

resposta de Interferon do tipo I, levando a ativação e maturação de células dendríticas mieloides e plasmocitoides (DA COSTA NEVES et al., 2009; PULENDRAN et al., 2013) e desempenhando um papel importante no desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa eficiente (Figura 4).

Figura 4 – Resposta imune celular induzida pela vacina de Febre Amarela

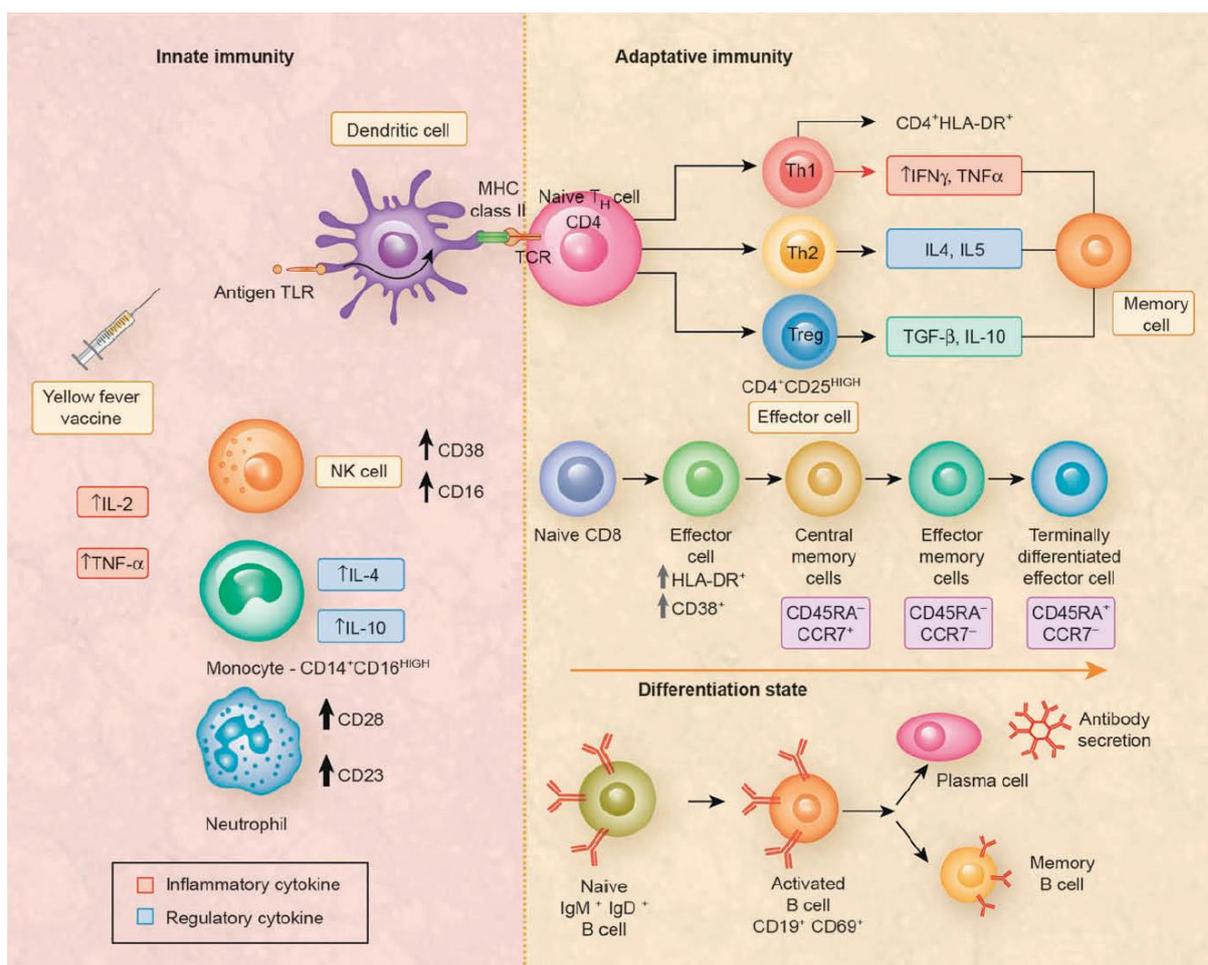


Figura 4 – Resposta imune celular induzida pela vacina de Febre Amarela. A figura resume as principais alterações imunológicas induzidas pela vacina contra a Febre Amarela. FONTE: FERREIRA et al., 2018.

Em um estudo que avaliou diferentes fenótipos de células da imunidade inata em adultos primovacinaados com a vacina antiamarilica 17DD, foi observado um perfil de ativação de neutrófilos com aumento da expressão das moléculas CD23 e CD28 e de eosinófilos com o aumento de CD28 e HLA-DR. Além disso, também foi demonstrado um elevado número de monócitos ativados (CD14⁺CD16^{high}) e pró-inflamatórios (CD14⁺CD16^{high}HLA-DR⁺) (MARTINS et al., 2008). Alguns estudos ressaltam o papel

das células NK no controle da viremia no início da infecção, devido a sua capacidade de limitar a propagação de patógenos e vírus e de desencadear uma resposta imune adaptativa antígeno-específica após a vacinação (NEVES et al., 2009; DELVES; ROITT, 2000).

A vacina antiamarílica induz a ativação de linfócitos gama-delta ($\gamma\delta$), que são as primeiras células a produzir IFN- γ , o qual irá auxiliar a maturação de células dendríticas e a polarização de linfócitos T CD4⁺ para uma resposta do tipo Th1 (NEVES et al., 2010, 2013).

O percentual de linfócitos T CD8⁺ se eleva significativamente no 5^o dia após a primovacinação (AHMED; AKONDY, 2011; AKONDY et al., 2015). No 15^o dia, há um aumento de linfócitos T CD8⁺ expressando moléculas de superfície (HLA-DR e CD38) importantes para a diferenciação de células efetoras (MARTINS et al., 2007). Já no 30^o dia pós-vacinação, há perda do fenótipo efetor para o fenótipo de memória, baseado na expressão das moléculas CD45RA e CCR7. Essa transição ocorre entre os dias 15-90 após a vacinação (AKONDY et al., 2015; BANNARD; KRAMAN; FEARON, 2009; BLOM et al., 2013).

A memória imunológica é a base da proteção induzida pela vacina, sendo as células T CD8⁺ um importante componente celular. Em infecções virais, as células T CD8⁺ de memória, após expansão clonal antígeno-específica, provocam a morte do patógeno por meio de mecanismos citotóxicos. Essa população celular desempenha um papel dinâmico frente à vacinação antiamarílica, com funções efetoras de longa duração, citotoxicidade direta, degranulação e secreção de citocinas antivirais (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e CCL4) (AKONDY et al., 2009; FUERTES MARRACO et al., 2015).

Em relação aos linfócitos T CD4⁺, há um aumento significativo dessa população celular quando a infecção está controlada (KOHLER et al., 2012; REINHARDT et al., 1998). De acordo com o microambiente, a polarização de células T CD4⁺ se modifica em respostas do tipo Th1 ou Th2, caracterizando uma resposta celular mista (GAUCHER et al., 2008; MARTINS et al., 2008). Em resposta à vacinação antiamarílica, há uma predominância na produção e secreção de IFN. Entretanto, foi demonstrada uma mudança no perfil de produção de citocinas por essa população celular, com maior produção da citocina IL-10 (CAMPI-AZEVEDO et al., 2016). É importante ressaltar que estudos que avaliaram a duração da resposta celular induzida pela vacina antiamarílica, observaram uma queda significativa e preocupante dos perfis de memória efetora de células T CD4⁺ e T CD8⁺ 10 anos após a

primovacinação, ressaltando a importância de se manter uma dose de reforço após esse período (CAMPI-AZEVEDO et al., 2016, 2019a).

No que se refere aos linfócitos B, ocorre uma proporção inversa em relação aos linfócitos T por volta de 7 dias pós-vacinação, quando os níveis de linfócitos B (CD19⁺) se reduzem e os de linfócitos T se elevam. Entretanto, após 15 dias há um aumento da população de linfócitos B, com consequente aumento na proporção de anticorpos neutralizantes devido a presença do fenótipo de ativação (CD19⁺CD69⁺) e aumento da expressão de IL-10R, importante citocina para a proliferação e diferenciação de linfócitos B (CAMPI-AZEVEDO et al., 2012; FERREIRA et al., 2018; KOHLER et al., 2012; MARTINS et al., 2007).

1.5.4 Dose fracionada da vacina antiamarílica

Em decorrência do agravamento do cenário epidemiológico da FA, houve um aumento na demanda de vacinas, com consequente esgotamento dos estoques vacinais. Dessa forma, foi proposta em 2016, pelo *Strategic Advisory Group of Experts* (SAGE) da OMS, a utilização da vacina de FA em doses com concentrações menores de partículas virais (1/5 da dose padrão) como uma possível solução emergencial (WHO, 2017). A menor concentração de partículas virais da vacina poderia ampliar rapidamente a capacidade de fornecimento da vacina de FA e suprir a necessidade mundial.

A estratégia do uso da dose fracionada consistiu na administração de 0,1mL da vacina ao invés de 0,5mL, ou seja, 1/5 da dose padrão. A OMS recomenda que a dose deva possuir uma concentração mínima 1.000UI. Além disso, a dose fracionada deve apresentar eficácia, segurança e imunogenicidade equivalente à dose padrão (WHO, 2016b, 2017).

Para suportar a utilização do uso fracionado da vacina antiamarílica, a OMS se baseou em estudos que demonstraram que 98% dos indivíduos apresentam anticorpos neutralizantes pós-vacinação com doses menores da vacina antiamarílica (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014; MARTINS et al., 2013; ROUKENS et al., 2018). Além disso, foi demonstrado que a vacina antiamarílica 17DD, produzida por Bio-Manguinhos, maior produtor mundial da vacina, tem em média 12x mais partículas virais do que o mínimo recomendado pela OMS (MARTINS et al., 2013).

Para atender a demanda do Ministério da Saúde, em 2009 foi realizado um estudo clínico de dose-resposta da vacina antiamarílica 17DD, produzida por Bio-Manguinhos. O estudo envolveu 900 adultos saudáveis, do sexo masculino, de Unidades Militares do Rio de Janeiro. Os voluntários foram divididos em 6 grupos compostos por 150 participantes, os quais receberam doses decrescentes da vacina, desde 27.476 UI/dose (dose padrão) até 31 UI/dose. Os resultados demonstraram que a vacina poderia ser utilizada em concentrações até 50x menores (a partir de 587 UI) do que a dose padrão. Além disso, a duração da imunidade se manteve em um ano de avaliação nos grupos vacinais, exceto para o grupo que recebeu a menor dose testada (31 UI) (MARTINS et al., 2013).

Dando continuidade ao estudo de dose-resposta, biomarcadores séricos solúveis foram avaliados e também foi observado que doses até 50x menores são capazes de induzir imunogenicidade similar à dose padrão. Entretanto, apenas doses de até 3.013 UI (10x menor que a dose padrão) foram capazes de induzir a produção da quimiocina CXCL-9, de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ e IL-2) e de citocinas moduladoras (IL-5 e IL-10) similar à dose padrão (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014).

Oito anos após a primovacinação, a mesma população foi avaliada e anticorpos neutralizantes foram determinados. O estudo demonstrou que os títulos de anticorpos neutralizantes se mantêm oito anos após a primovacinação no grupo de indivíduos que receberam doses a partir de 587 UI (MARTINS et al., 2018).

Baseado nessas evidências científicas, na súbita demanda pela vacina antiamarílica e na recomendação da OMS, em 2018 o Ministério da Saúde do Brasil anunciou o uso da dose fracionada em três estados brasileiros (Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo) como uma das estratégias de imunização em decorrência da situação emergencial (OPAS; OMS, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Embora a vacina contra a FA seja uma das mais imunogênicas existentes, estudos anteriores demonstraram que alguns fatores podem afetar as respostas induzidas pela vacina, incluindo características relacionadas ao hospedeiro (idade, nutrição, genética e microbioma) e aspectos ambientais (regiões endêmicas vs não endêmicas, coinfeção e exposição a Flavivírus heterólogos) (BIFANI; ONG; DE ALWIS, 2020; JEAN et al., 2016; MUYANJA et al., 2014). Com a recente ampliação da recomendação vacinal no Brasil para todo o território nacional, incluindo áreas sem circulação do vírus da FA, informações detalhadas sobre o impacto do status sorológico prévio para Flavivírus e a influência da idade na resposta imune induzida pela vacina ainda precisam ser elucidadas em indivíduos residentes em áreas sem circulação do vírus da FA, uma vez que a maioria dos estudos existentes foram realizados em áreas com circulação do vírus.

Além disso, em 2016 foi proposto pelo *Strategic Advisory Group of Experts* (SAGE) da OMS, a utilização da vacina de FA em doses com concentrações menores de partículas virais (1/5 da dose padrão) como uma possível solução emergencial para ampliar a capacidade de fornecimento da vacina (WHO, 2016a). Diante disso, também são necessários estudos que avaliem se a imunização de indivíduos com doses menores da vacina antiamarílica é eficaz do ponto de vista da resposta imune humoral e celular.

Com esta proposta, existe a oportunidade de avaliar o impacto do status sorológico prévio para Flavivírus e também a influência da idade na resposta imune induzida pela vacina antiamarílica em indivíduos residentes em áreas sem circulação do vírus amarelo após a vacinação com a dose padrão da vacina 17DD. Além disso, também será possível avaliar o perfil da resposta imune humoral e celular antígeno-específica para FA em indivíduos submetidos à primovacinação com a dose fracionada (1/5 da dose padrão) da vacina antiamarílica 17DD.

Dessa forma, o estudo poderá fornecer evidências científicas relevantes para subsidiar programas de saúde pública com correlatos de proteção para áreas sem circulação do vírus de FA e sobre a resposta imune induzida pela dose fracionada da vacina antiamarílica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a imunidade vacinal antiamarílica 17DD induzida pela dose padrão e dose fracionada empregando análise exploratória multiparamétrica de biomarcadores fenotípicos e funcionais.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o impacto do status sorológico prévio para Flavivírus (Febre Amarela, Dengue e Zika) na resposta celular específica para FA em indivíduos residentes em áreas sem circulação do vírus amarílico após a vacinação com a dose padrão da vacina 17DD;
2. Avaliar a influência da idade na produção de anticorpos neutralizantes e biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA em indivíduos residentes em áreas sem circulação do vírus amarílico após a primovacinação com a dose padrão da vacina 17DD;
3. Caracterizar o perfil de anticorpos neutralizantes e mediadores solúveis em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina 17DD;
4. Caracterizar o perfil de biomarcadores fenotípicos e funcionais em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina 17DD.

4 METODOLOGIA

4.1 População de estudo

Este é um estudo observacional o qual incluíram grupos de indivíduos de diferentes faixas etárias, que nunca receberam a vacina de FA, segundo registro do cartão de vacinação, e que concordaram em participar voluntariamente do estudo. O estudo foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou, FIOCRUZ-Minas (CAAE #51160215.7.0000.5091; CAAE #82357718.5.0000.5091), da Universidade Federal da Paraíba (CAAE #51160215.7.3001.5183), do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (CAAE #82357718.5.3001.5262) e do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (CAAE #82357718.5.3002.0061). Todos os participantes ou seus responsáveis legais leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes da inclusão no estudo. Esta investigação atende aos princípios da declaração de Helsinque e da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos.

Para cumprir os objetivos específicos 1 e 2 deste estudo, foram selecionadas 2 amostragens populacionais. No total, 576 voluntários foram incluídos, sendo 288 crianças de 9 meses a 4 anos de idade e 288 adultos de 18 a 49 anos residentes dos municípios Alhandra, Caaporã e Conde no estado da Paraíba (áreas sem circulação do vírus de FA). Amostras de 5mL de sangue periférico de tubos sem anticoagulante foram coletadas de todos os voluntários para a avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes pelo teste *Micro Plaque Reduction Neutralization – Horseradish Peroxidase* (μ PRN-HRP), o qual foi realizado no Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos (LATEV/BIO). Também foi realizada a avaliação de IgG para Dengue e para Zika através do teste rápido realizado pelo mesmo laboratório. Amostras de sangue periférico (10-20mL) em tubos sem anticoagulante e com gel separador foram coletadas para avaliação de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA em indivíduos residentes em áreas sem circulação do vírus amarelo através da obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) provenientes do coágulo sanguíneo, o qual foi realizado no Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores do Instituto René Rachou/Fiocruz-Minas (Figura 5).

Figura 5 – Fluxograma da população de estudo, desenho e métodos referente aos objetivos específicos 1 e 2

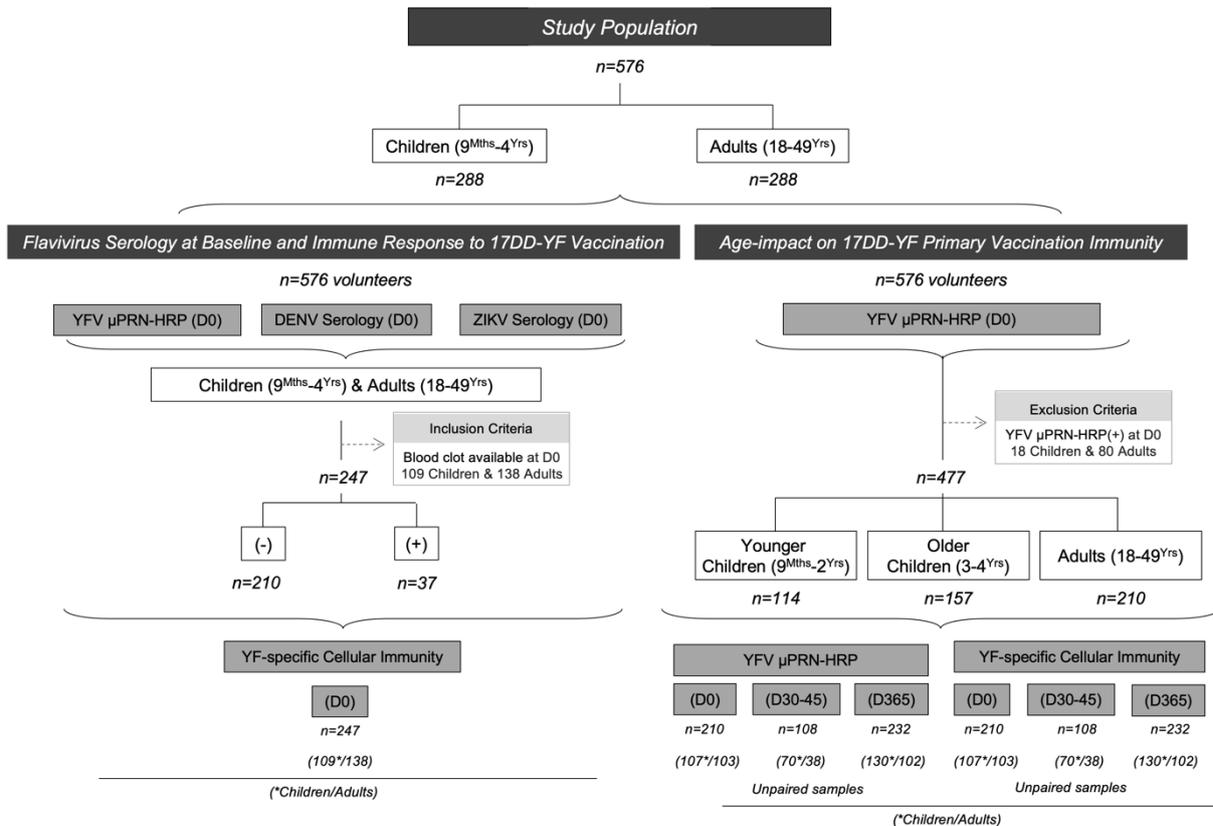


Figura 5 – Fluxograma da população de estudo, desenho e métodos referente aos objetivos específicos 1 e 2. A população de estudo é composta por 576 voluntários incluindo: crianças (n=288, ambos os sexos, idade entre 9 meses e 4 anos) e adultos (n=288, ambos os sexos, idade entre 18 e 49 anos). Trata-se de uma investigação observacional realizada em uma área sem circulação do vírus de FA no Brasil composto por dois braços independentes. O fluxograma resume o desenho e métodos experimentais de cada braço. O primeiro braço do estudo (“Sorologia para Flavivírus na Linha de Base e Resposta Imunológica à Vacinação antiamarilica 17DD”) tem como objetivo avaliar o impacto do status da sorologia prévia para flavivírus - “Anticorpos neutralizantes para FA (D0)”, “Sorologia para DENGUE (D0)” e “Sorologia para ZIKA (D0)” - na imunidade celular específica para FA (D0) em amostras de Crianças (9^{Meses}-4^{Anos}) e Adultos (18-49^{Anos}) categorizadas como : (-) e (+) de acordo com o status sorológico de flavivírus na linha de base. O segundo braço do estudo (“Impacto da idade na resposta celular específica para FA após vacinação antiamarilica 17DD”) tem como objetivo determinar o impacto da idade na primovacinação antiamarilica 17DD com base na análise de anticorpos neutralizantes de FA - μ PRN-HRP (D0; D30-45 e D365) e imunidade celular específica de FA (D0; D30-45 e D365) em amostras de Crianças mais novas (9^{Meses}- 2^{Anos}), Crianças mais velhas (3-4^{Anos}) e Adultos (18-49^{Anos}). Neste braço, voluntários com anticorpos neutralizantes positivos para FA - μ PRN-HRP foram excluídos (18 crianças e 80 adultos). FONTE: REIS et al., 2021.

Para cumprir o objetivo específico 3 e 4, foram incluídos 15 adultos, de 18 a 57 anos, primovacinados com a dose fracionada da vacina antiamarilica 17DD durante campanha de vacinação em massa no Rio de Janeiro. Para isso, foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos sem anticoagulante para caracterização do perfil de mediadores solúveis no soro e amostras de sangue contendo heparina sódica como anticoagulante para avaliação de biomarcadores fenotípicos e funcionais de memória antígeno-específica para FA através da obtenção de PBMC, o qual foi realizado no Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores do Instituto René Rachou/Fiocruz-Minas e no *The Human Immune Monitoring Center (HIMC)* da Stanford University, EUA (Figura 6).

Figura 6 – Fluxograma da população de estudo, desenho e métodos referente aos objetivos específicos 3 e 4

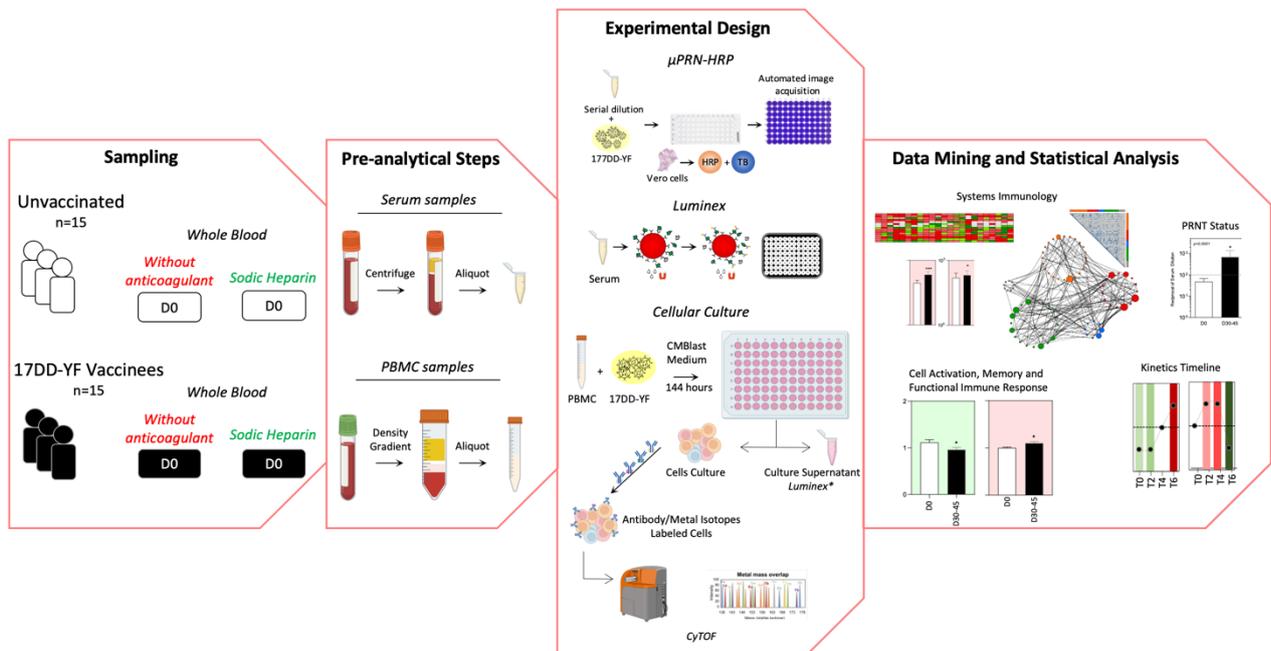


Figura 6 – Fluxograma da população de estudo, desenho e métodos referente aos objetivos específicos 3 e 4. A população de estudo é composta por 15 adultos, ambos os sexos, idade entre 18 e 57 anos. O fluxograma resume o desenho e métodos experimentais do estudo. Foram utilizadas amostras de sangue periférico em tubos sem anticoagulante para caracterização do perfil de mediadores solúveis por Luminex e amostras de sangue periférico em tubos contendo heparina sódica como anticoagulante para avaliação de biomarcadores fenotípicos e funcionais de memória antígeno-específica para FA por citometria de massa. FONTE: elaborado pelo autor.

4.2 Critérios de elegibilidade

Foram elegíveis para o estudo indivíduos que nunca receberam a vacina de FA, verificada em cartão de vacina e anamnese, e que concordaram em participar voluntariamente do estudo. Foi chamada a atenção no Cartão de Imunização da Criança que ela participou do estudo sobre a vacina de FA. Além disso, os participantes não puderam receber a vacina 17DD atenuada de FA simultaneamente com as vacinas Tríplice Viral (vacina combinada contra sarampo, rubéola e caxumba) ou Tetra Viral (tríplice mais varicela), respeitando um intervalo de pelo menos um mês entre estas e a de FA. Estas restrições não se aplicaram as demais vacinas do calendário básico de imunizações.

4.2.1 Critérios de inclusão

- Capacidade de entender e assinar o TCLE;
- Aceitação de participação no estudo após leitura, compreensão e assinatura do TCLE;
- Participantes de ambos os sexos com idades entre 9 meses e 4 anos, desde que não tenham recebido ou deveriam receber a vacina Tríplice Viral ou Tetra Viral em um intervalo de 30 dias ou menos;
- Adultos saudáveis de ambos os sexos com idade entre 18 e 49 anos desde que não tenham recebido ou deveriam receber a vacina Tríplice Viral ou Tetra Viral em um intervalo de 30 dias ou menos;
- Residência fixa no município onde se localiza a Unidade Básica de Saúde (UBS) em que foram realizadas a vacinação e as coletas de material biológico (sangue) para o estudo;
- Disponibilidade para as atividades de acompanhamento durante todo o período do estudo, bem como de seguir o protocolo do estudo;
- Concordar em fornecer dados pessoais como nome, endereço, telefone e outras informações pessoais para que fosse possível o contato, caso necessário;
- Boas condições de saúde e sem história médica significativa;
- Exame físico de triagem sem alterações clínicas significativas.

4.2.2 Critérios de exclusão

- Vacinação anterior contra FA;
- Gestação presumida ou confirmada, em qualquer fase;
- Mulheres em amamentação;
- Histórico pessoal de reação anafilática a alimentos, medicamentos ou vacinas;
- Histórico de alergia ao ovo e seus componentes, eritromicina, canamicina ou gelatina;
- Doenças imunomediadas (artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren e esclerose múltipla), que tenham feito ou não uso de medicamentos imunossupressores;
- Soropositividade para HIV;
- Histórico de doenças do timo, tais como timoma, miastenia gravis e timectomia devido à timoma;
- Recebimento de imunoglobulina, transfusões de sangue ou derivados nos últimos 60 dias;
- Vacinação de vírus vivos ou contra cólera nos últimos 30 dias, ou que planejavam recebê-las nos 30 dias seguintes após a vacinação contra FA;
- Indivíduos que tenham residido em áreas endêmicas de FA;
- Doença febril aguda, com comprometimento do estado geral de saúde.

4.3 Procedimentos laboratoriais

4.3.1 Titulação de anticorpos neutralizantes (μ PRN-HRP)

O título de anticorpos neutralizantes dos participantes do estudo foi determinado pelo teste *Micro Plaque Reduction Neutralization – Horseradish Peroxidase* (μ PRN-HRP) em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos/Fiocruz-Rio. O μ PRN-HRP foi realizado conforme a Figura 7 e previamente descrito por Simões (2018).

De forma resumida, o μ PRN-HRP foi realizado em placas de 96 poços utilizando diluições seriadas do soro (fator 3 – de 1:6 a 1:1458) e aproximadamente 100 PFU/poço do vírus vacinal 17D-213/77. Uma coluna da microplaca foi reservada para

o controle de vírus (meio 199 + suspensão viral) e as bordas para o controle de células (somente meio 199 + células). Para a etapa de neutralização, a mistura de soro e suspensão viral foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂.

Após a incubação, as misturas foram transferidas para outra placa de 96 poços contendo monocamadas de células Vero ATCC pré-formadas (24 horas) para a etapa de adsorção durante 1 hora a 37°C e 5% CO₂. Finalizada essa etapa, as misturas foram removidas e substituídas por meio semissólido de carboximetilcelulose a 2% (CMC) seguido de incubação por 48 horas a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as monocamadas foram lavadas e fixadas com solução etanol-metanol (1:1) por pelo menos 1 hora a -20°C e posteriores lavagens foram realizadas. Após a etapa de fixação, foi adicionado o anticorpo monoclonal conjugado com HRP (4G2) diluído na solução bloqueadora (0,5% BSA, 0,5% de bloqueador caseína diluídos em água destilada) e as placas foram incubadas por 2 horas a 35°C e 5% CO₂.

Subsequentemente, as monocamadas foram lavadas com *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) antes de adicionar o substrato *True Blue* (TB). Após 15 minutos de incubação no escuro e em temperatura ambiente, as monocamadas foram lavadas novamente com água destilada e, quando secas, foram fotografadas usando um sistema de aquisição de imagem automatizado previamente descrito por Denani et al., 2020 e as placas foram contadas manualmente (DENANI et al., 2020).

Figura 7 – Esquema do protocolo de execução do teste μ PRN-HRP de FA

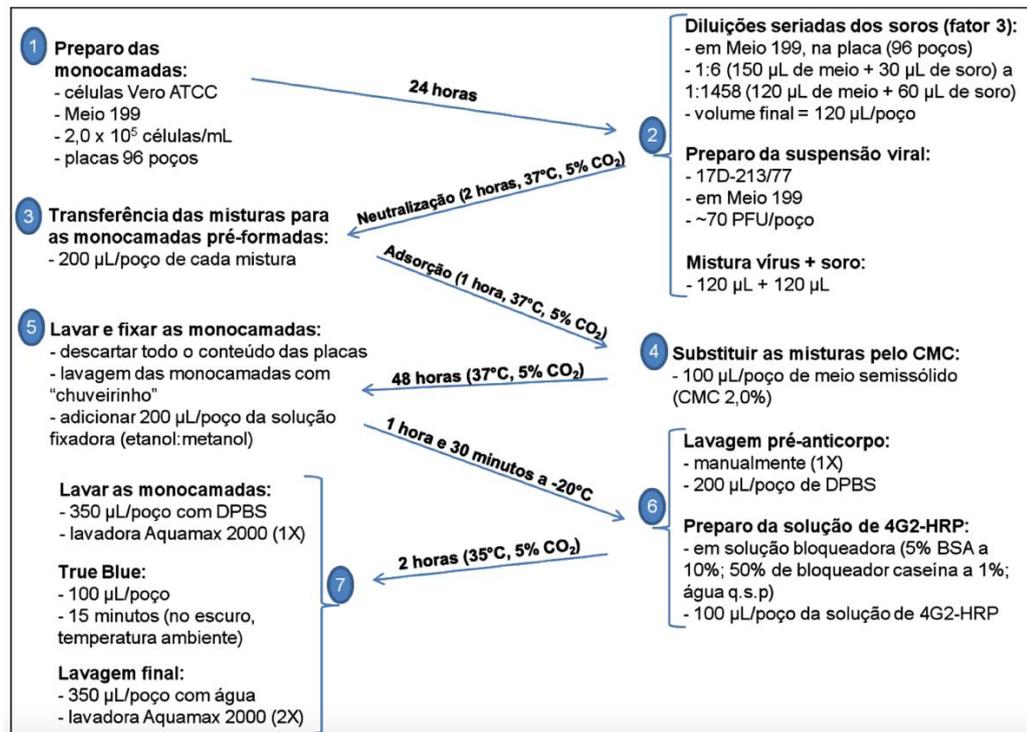


Figura 7 – Esquema do protocolo de execução do teste de neutralização μ PRN-HRP de FA. O teste consiste no preparo das monocamadas celulares, diluição seriada dos soros, neutralização do vírus, adsorção às células Vero, substituição das misturas por meio semissólido, fixação das monocamadas, tratamento com anticorpo monoclonal conjugado à enzima peroxidase para o reconhecimento dos vírus não neutralizados, adição de um substrato da enzima, lavagens entre as etapas e revelação do tipo imunoenzimático. FONTE: SIMÕES, 2018.

O título de anticorpos neutralizantes foi calculado por regressão linear considerando os valores das recíprocas das diluições e os números de placas de lise imediatamente inferior e superior a 50%. Dessa forma, o título foi definido como a recíproca da última diluição do soro que reduziu o número de placas de lise em 50% em comparação com o controle. O título médio do soro padrão permitiu a determinação das unidades internacionais de proteção contidas em cada amostra (SIMÕES et al., 2012).

4.3.2 Determinação de IgG para DENGUE

A determinação de IgG para DENGUE foi realizada por meio do kit ELISA comercialmente disponível (kit Panbio dengue IgG ELISA indireto, Abbott

Laboratories, Chicago, IL, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em unidades relativas/mL.

4.3.3 Determinação de IgG para ZIKA

A determinação de IgG total para ZIKA foi realizada por meio do kit comercialmente disponível (TR DPP® Zika IgM / IgG - Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como intensidade de banda fornecida por um micro leitor disponível pelo fabricante.

4.3.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a partir de coágulo sanguíneo

As amostras de sangue de tubos sem anticoagulante contendo gel separador foram preparadas a fim de obter PBMC a partir do coágulo sanguíneo. Primeiramente, as amostras foram submetidas à centrifugação a uma rotação de 3.000rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Amostras de soro foram coletadas e armazenadas a -80°C para a análise da resposta de anticorpos para Flavivírus (FA, DENGUE e ZIKA). Os coágulos foram removidos cuidadosamente com o auxílio de uma pinça cirúrgica, imediatamente transferidos para uma placa de Petri e lavados com *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 incompleto (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, DE). Em seguida, os coágulos foram rompidos com pinça cirúrgica e transferidos para um *Cell-Strainer* acoplado a um tubo de polipropileno de 50mL. Com o auxílio de um êmbolo de uma seringa de 10mL, os coágulos foram macerados e filtrados para remoção de fragmentos grandes e fibrina. Posteriormente, o coágulo filtrado foi diluído em meio RPMI-1640 até obter um volume final de 20mL. A solução de coágulo macerado e RPMI 1640 incompleto foi transferida lentamente para uma solução de Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, DE) na proporção 2:1 para obtenção de PBMC. As amostras foram centrifugadas a 500 x g (SL 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) durante 40 minutos a 22°C (ACC=3; DCC=3). Ao final da centrifugação, um anel de PBMC foi obtido entre a interface do Histopaque®-1077 e do meio de cultura. As PBMC foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno de 50mL seguido de uma lavagem com meio

RPMI 1640 incompleto a 1.300rpm (SL 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) por 7 minutos a 4°C (ACC=9; DEC=3). Em caso de presença de eritrócitos, foi realizada uma etapa de lise utilizando solução de cloreto de amônio 1x e posterior centrifugação a 1.300rpm (SL 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) por 7 minutos a 4°C (ACC=9; DEC=3). Após a etapa de lise, as PBMC foram submetidas a uma segunda lavagem com meio RPMI 1640 incompleto nas mesmas condições de centrifugação da etapa anterior para retirada de vestígios de cloreto de amônio. Por fim, as células foram ressuspendidas em meio RPMI-1640 incompleto, contadas no contador automático Countess™ (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) e ajustadas para uma concentração final de $2,0 \times 10^7$ células/mL. As células foram mantidas no gelo até o uso nas culturas *in vitro*.

Toda a manipulação, exceto a contagem de células, foi realizada em condições estéreis em capela de fluxo laminar.

4.3.5 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a partir de sangue heparinizado

As amostras de sangue de tubos contendo heparina como anticoagulante foram preparadas a fim de obter PBMC. Primeiramente, as amostras foram submetidas à centrifugação a uma rotação de 3.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente para retirada do plasma sanguíneo. O creme leucocitário juntamente com a papa de hemácias foram diluídos em meio RPMI-1640 incompleto na proporção 1:1. Posteriormente, a mistura foi transferida lentamente para uma solução de Histopaque®-1077 na proporção de 2:1 para obtenção de PBMC. As amostras foram centrifugadas a 1.800rpm durante 40 minutos a 20°C (ACC=3; DCC=3). Ao final da centrifugação, um anel de PBMC foi obtido entre a interface do Histopaque®-1077 e do meio de cultura. As PBMC foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno de 50mL seguido de uma lavagem com meio RPMI 1640 incompleto a 1.300rpm por 7 minutos a 4°C (ACC=9; DEC=3). Em caso de presença de eritrócitos, foi realizada uma etapa de lise utilizando solução de cloreto de amônio 1x e posterior centrifugação a 1.300rpm por 7 minutos a 4°C (ACC=9; DEC=3). Após a etapa de lise, as PBMC foram submetidas a uma segunda lavagem com meio RPMI 1640 incompleto nas mesmas condições de centrifugação da etapa anterior para retirada

de vestígios de cloreto de amônio. Por fim, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 incompleto, contadas no contador automático Countess™ (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e ajustadas para uma concentração final de $1,0 \times 10^7$ células/mL. As células foram adicionadas a uma solução de congelamento (60% de solução crioprotetora HES-20%, 40% de soro fetal bovino inativado, 10% de DMSO estéril, 5000 UI/mL de heparina sódica) e armazenadas a -80°C para posterior avaliação de biomarcadores fenotípicos e funcionais de memória antígeno-específica para FA.

Toda a manipulação, exceto a contagem de células, foi realizada em condições estéreis em capela de fluxo laminar.

4.3.6 Protocolo de descongelamento de PBMC

Amostras de PBMC previamente congeladas e armazenadas à -80°C foram descongeladas e utilizadas para avaliação de biomarcadores fenotípicos e funcionais de memória antígeno-específica para FA. Inicialmente, foi preparada uma solução de meio de cultura CMBlast (5% de soro humano, 1,6% de L-glutamina e 3% de antibiótico+antimicótico diluídos em RPMI incompleto), previamente aquecido em banho maria a 37°C , acrescido de benzonase a 1:10.000. As amostras de PBMC foram transportadas cuidadosamente em gelo seco e descongeladas em banho maria a 37°C . Próximo ao descongelamento total, as amostras foram encaminhadas imediatamente para a capela de fluxo laminar. Posteriormente, foi adicionado lentamente ao criotubo de PBMC 1mL da solução de CMBlast contendo benzonase e transferido para um tubo de polipropileno de 15mL contendo 10mL da mesma solução. As células foram centrifugadas a 2.000rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o pellet contendo as células foi ressuspensado em 0,5-1mL de meio CMBlast. Por fim, as células foram contadas no contador Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA) e ajustados para uma concentração final de $2,0 \times 10^7$ células/mL. As células foram mantidas no gelo até o uso nas culturas *in vitro*.

4.3.7 Cultura celular *in vitro* antígeno-específico para FA de longa duração

Para avaliar biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA em amostras de PBMC obtidas a partir de coágulo sanguíneo, as células permaneceram em cultura por 6 dias (144 horas) na ausência e na presença do antígeno vacinal 17DD ($2,5 \times 10^3$ /mL partículas virais).

A cultura foi realizada em placas de 96 poços de fundo U, dos quais quatro poços foram destinados para avaliação de linfócitos T (LT) – dois poços para cultura controle (CC - ausência do antígeno vacinal 17DD) e dois poços para cultura estimulada (CE - presença do antígeno vacinal 17DD) – e quatro poços para avaliação de linfócitos B (LB), utilizando a mesma estratégia de distribuição de poços.

Adicionalmente, foi realizado um controle positivo a partir de células estimuladas com meio de cultura acrescido de $1,25 \mu\text{g}/\text{mL}$ de Fitohemaglutinina (PHA) e um controle de células não marcadas com anticorpos monoclonais fluorescentes (CG – controle de ajuste do *gate* de linfócitos no citômetro de fluxo), o qual as células foram incubadas apenas com o meio de cultura.

O meio de cultura utilizado nas culturas foi o meio CMBlast (5% de soro fetal humano + 1,6% de L-glutamina + 3% de antibiótico e antimicótico + RPMI 1640 incompleto). O volume final em cada poço foi de $200 \mu\text{L}$, sendo $162,5 \mu\text{L}$ de CMBlast e $25 \mu\text{L}$ de PBMC ($5,0 \times 10^5$ células). Para os poços de CE, foram adicionados $12,5 \mu\text{L}$ do antígeno vacinal e para os de CC e CG $12,5 \mu\text{L}$ de RPMI 1640 incompleto.

As placas de cultura de 96 poços foram incubadas por 6 dias (144 horas) a 37°C e 5% CO_2 em estufa úmida.

4.3.8 Análise de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA por citometria de fluxo

Após cultura de 6 dias (144 horas), as células foram submetidas à marcação de moléculas de superfície utilizando anticorpos fluorescentes específicos para as populações celulares de interesse. Para isso, as PBMC foram centrifugadas para retirada do meio de cultura e em seguida ressuspendidas e lavadas com tampão salina fosfato 1x (PBS 1x). Após a lavagem, as células foram incubadas com corante LIVE/DEAD™ *Fixable Violet Dead Cell Stain* (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), o qual permite o reconhecimento das células viáveis e exclusão das células mortas na análise dos dados adquiridos por citometria de fluxo.

Em seguida, as PBMC foram lavadas com tampão salina fosfato suplementado com 0,5% de albumina bovina estéril (*PBS-Wash*) e incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz com uma mistura de anti-moléculas de superfície previamente preparadas para identificação de linfócitos T (anti-CD3/SK7/APC-Cy7; anti-CD4/RPA-T4/FITC; anti-CD8/SK1/PerCP-Cy5.5; anti-CD27/M-T271/PE; anti-CD45RO/UCHL1/PE-Cy7; anti-CD183/1C6/APC) e linfócitos B (anti-IgD/IA6-2/FITC; anti-CD27/M-T271/PE; anti-CD19/HIB19/PerCP-Cy5.5) de memória.

Após a incubação, as células foram lavadas com *PBS-Wash* e fixadas com solução a base de formaldeído (citrato de sódio + formaldeído + dietilenoglicol + heparina sódica) por 10 minutos. Posteriormente, as PBMC foram lavadas com *PBS-Wash* e ressuspensas em PBS 1x para posterior aquisição de cerca de 100.000 linfócitos por amostra no citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Bioscience, San Diego, California, EUA).

Diferentes estratégias de análise foram empregadas para a avaliação de biomarcadores fenotípicos de memória em células T e B por citometria de fluxo.

Para a análise de subpopulações de linfócitos T de memória, foi utilizado o software FlowJo™ v10.8 (Ashland, OR, EUA), conforme ilustrado na Figura 8. Inicialmente, células individualizadas (*singlets*) foram selecionadas na região 1 (R1) empregando gráficos de distribuição de tamanho (*Forward Scatter* – FSC) expressos em área/*Area* e altura/*Hight* (FSC-A x FSC-H) para exclusão de agregados celulares (*doublets*). Em seguida, células viáveis foram selecionadas na região 2 (R2) empregando a marcação com corante vital *Live-Dead* em gráficos de distribuição de FSC-A x *Live-Dead*. A partir desta seleção, linfócitos totais foram selecionados na região 3 (R3) empregando os parâmetros de tamanho (*Forward Scatter* - FSC) e granulosidade (*Side Scatter* - SSC) expressos em área/*Area* (FSC-A x SSC-A). Em seguida, células adquiridas em fluxo contínuo sem interrupção foram selecionadas na região 4 (R4) utilizando gráficos de distribuição tempo/*Time* x FSC-A. Células T (CD3⁺) foram selecionadas a partir dos parâmetros CD3 APC-Cy7 x SSC-A com posterior seleção de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ em gráficos CD4 FITC x CD8 PerCP-Cy5.5. Após seleção das subpopulações de interesse (CD4⁺ ou CD8⁺), foi realizada a avaliação dos fenótipos de memória. Neste sentido, os fenótipos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram caracterizados utilizando os seguintes parâmetros: *naïve* (N = CD27⁻/CD45RO⁻), *early effector* (eEf = CD27⁻/CD45RO⁻), memória central (CM = CD27⁺/CD45RO⁺), memória efetora (EM = CD27⁻/CD45RO⁺), *naïve** (N* = CD183⁻

/CD45RO⁻), *early activated* (eA = CD183⁺/CD45RO⁻), memória não mediada por Interferon-gama (nIFN-M = CD183⁻/CD45RO⁺), memória mediada por Interferon-gama (IFN-M = CD183⁺/CD45RO⁺).

Figura 8 - Estratégia de análise para avaliação de Linfócitos T de memória

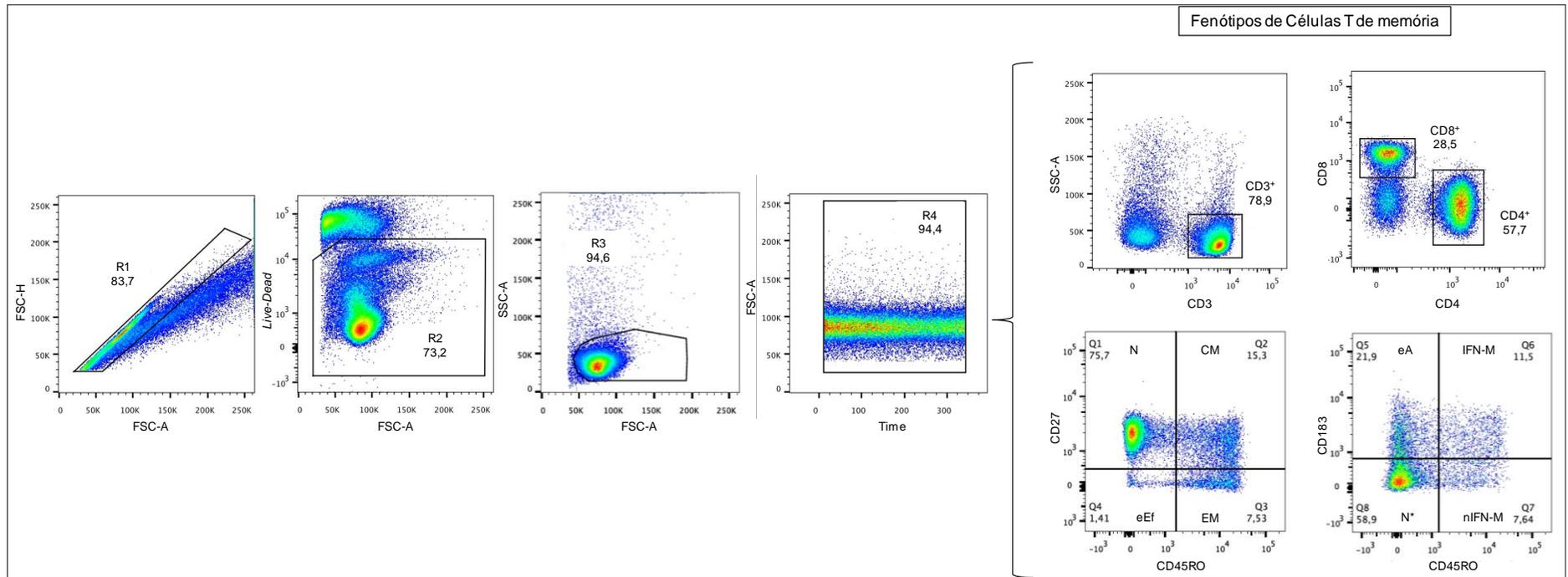


Figura 8 – Estratégia de análise para avaliação de linfócitos T de memória. FONTE : elaborado pelo autor.

A análise de subpopulações de linfócitos B também foi realizada empregando o software FlowJo™ v10.8 (Ashland, OR, EUA), conforme ilustrado na Figura 9. Inicialmente, células individualizadas (*singlets*) foram selecionadas na região 1 (R1) empregando gráficos de distribuição de tamanho (*Forward Scatter* – FSC) expressos em área/*Area* e altura/*Hight* (FSC-A x FSC-H) para exclusão de agregados celulares (*doublets*). Em seguida, células viáveis foram selecionadas na região 2 (R2) empregando a marcação com corante vital *Live-Dead* em gráficos de distribuição de FSC-A x *Live-Dead*. A partir desta seleção, linfócitos totais foram selecionados na região 3 (R3) empregando os parâmetros de tamanho (*Forward Scatter* - FSC) e granulocidade (*Side Scatter* - SSC) expressos em área/*Area* (FSC-A x SSC-A). Em seguida, células adquiridas em fluxo contínuo sem interrupção foram selecionadas na região 4 (R4) utilizando gráficos de distribuição tempo/*Time* x FSC-A. Células B (CD19⁺) foram selecionadas a partir dos parâmetros CD19 PerCP-Cy5.5 x CD3 APC-Cy7 para separação da população CD19⁺. Após seleção da população de interesse (CD19⁺), células B foram caracterizadas utilizando os seguintes parâmetros: *naïve* (N = CD19⁺/CD27⁻/IgD⁺), *early effector* (eEf = CD19⁺/CD27⁻/IgD⁻), memória não clássica (nCM = CD19⁺/ CD27⁺/IgD⁺) e memória clássica (CM = CD19⁺/CD27⁺/IgD⁻).

Figura 9 - Estratégia de análise para avaliação de Linfócitos B de memória

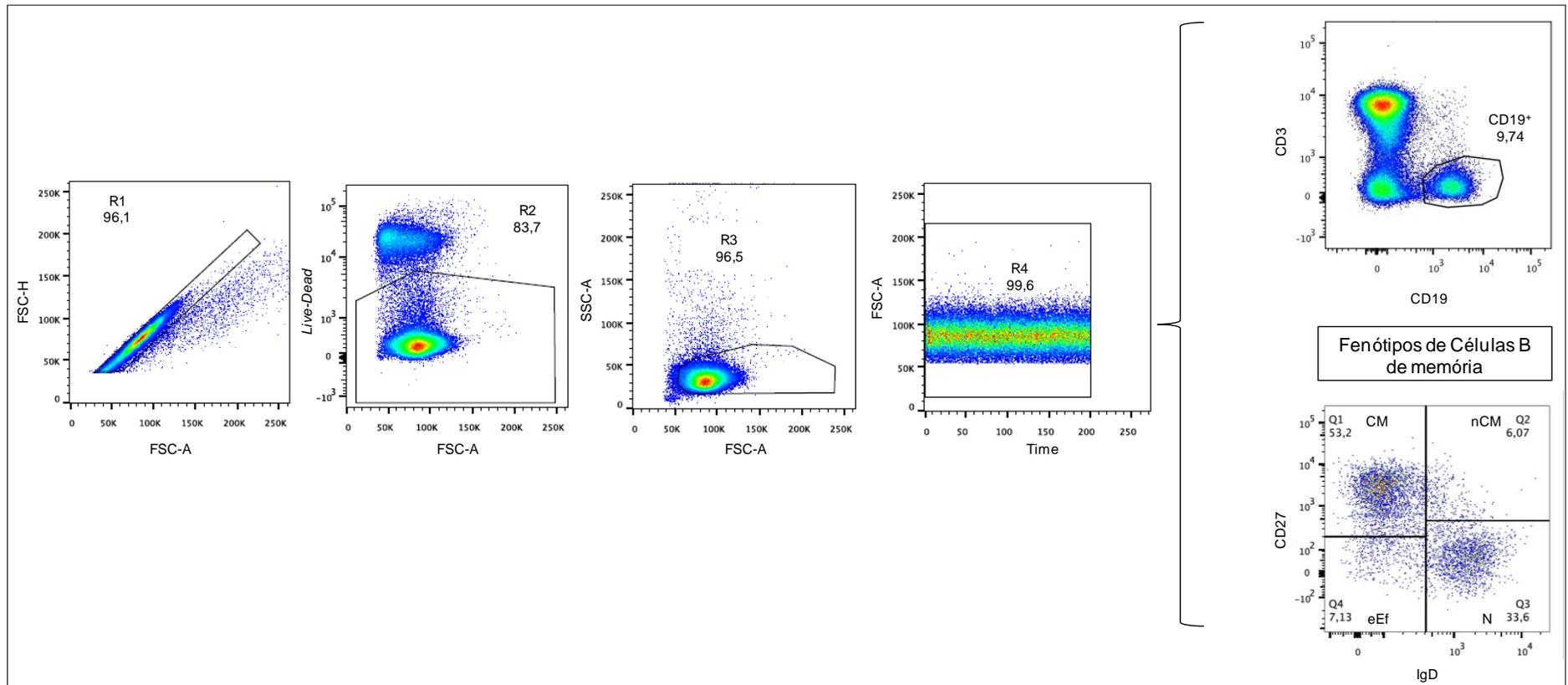


Figura 9 – Estratégia de análise para avaliação de linfócitos B de memória. FONTE: elaborado pelo autor.

4.3.9 Análise de biomarcadores fenotípicos e funcionais antígeno-específica para FA por citometria de massa (CyTOF)

Amostras de PBMC previamente congeladas e armazenadas à -80°C foram descongeladas para avaliação de biomarcadores fenotípicos e funcionais antígeno-específica para FA por Citometria de Massa por Tempo de Voo (CyTOF). Após cultura de 6 dias (144 horas), as células foram submetidas à marcação de moléculas de superfície utilizando anticorpos ligados a íons metálicos específicos para as populações de interesse (LIN; GUPTA; MAECKER, 2015).

Quatro horas antes do término da cultura, foram adicionados 10µL de Brefeldina A (200mg/mL) para retenção das citocinas no complexo de Golgi e posterior detecção por CyTOF. Após esse período, foram adicionados 20µL de EDTA (20mM) seguido por uma incubação de 15 minutos. Após a incubação, as placas foram centrifugadas para retirada do meio de cultura. Em seguida, as PBMC foram lavadas duas vezes com 250µL de tampão CyFACS (CyPBS 1x + 0,1% BSA + 1mM EDTA e 0,05% de azida de sódio) seguida de uma centrifugação a 1.550 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, as PBMC foram incubadas com um coquetel de anticorpos de superfície, marcados com íons metálicos, por 45 minutos no gelo, para identificação de linfócitos T (anti-CD3/UCHT1/154Sm; anti-CD4/RPA-T4/145Nd; anti-CD8/RPA-T8/146Nd; anti-CD45RA/HI100/153Eu; anti-CCR7/150503/169Tm) e linfócitos B (anti-CD19/HIB19/142Nd; anti-IgD/IA6-2/170Er; anti-CD27/L128/167Er) de memória e ativação celular (anti-CD28/L283/155Gd; anti-CD57/HCD57/113In; anti-CD107a/H4A3/151Eu - adicionado durante a estimulação; anti-CD27/L128/167Er; anti-CD38/HB-7/156Gd, anti-PDL1/29E.2A3/175Lu; anti-PDL2/24F.10C12/172Yb).

Após a incubação, as placas foram lavadas duas vezes em 250µL de tampão CyFACS seguida de uma centrifugação a 1.550 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi preparada uma diluição 1:3.000 de Maleimida-DOTA/115In (5mg/mL) em CyPBS (PBS 1x sem contaminantes de metais pesados) para marcação e reconhecimento das células viáveis. As células foram ressuspensas em 100µL da diluição preparada de Maleimida-DOTA/115In e incubadas por 30 minutos no gelo. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes em tampão CyFACS, ressuspensas em 100µL de Paraformaldeído (PFA) a 2% em CyPBS e incubadas a 4°C *overnight*.

No dia seguinte, as PBMC foram lavadas duas vezes em tampão de permeabilização à base de saponina 1x em água Milli-Q e centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos à 4°C. Após as lavagens, as células foram incubadas em um coquetel de anticorpos intracelular, marcados com íons metálicos, por 45 minutos no gelo, para identificação de ativação celular (anti-CTLA-4/14D3/149Sm; anti-GranzimaB/GB11/171Yb; anti-Perforina/B-D48/173Yb) e citocinas (anti-TNF α /Mab11/152Sm; anti-IFN γ /4S.B3/161Dy; anti-IL-4/MP4-25D2/144Nd; anti-IL-5/BVD2-21C11/159Tb; anti-IL-10/JES3-9D7/143Nd; anti-IL-17/N49-853/164Dy; anti-IL-2/MQ1-17h12/166Er). Após incubação, as PBMC foram lavadas três vezes em tampão CyFACS, ressuspensas em 100 μ L de Ir-Intercalador diluído 1:2.000 em PFA 2% em CyPBS e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes em tampão CyFACS seguida de mais três lavagens em água Milli-Q. Para leitura no CyTOF, as PBMC foram ressuspensas em 1-1,5mL de água Milli-Q.

A análise das populações celulares foi realizada empregando o software Cytobank Premium (Beckman Coulter) conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - Estratégia de análise para avaliação de biomarcadores fenotípicos e funcionais antígeno-específica para FA por citometria de massa (CyTOF)

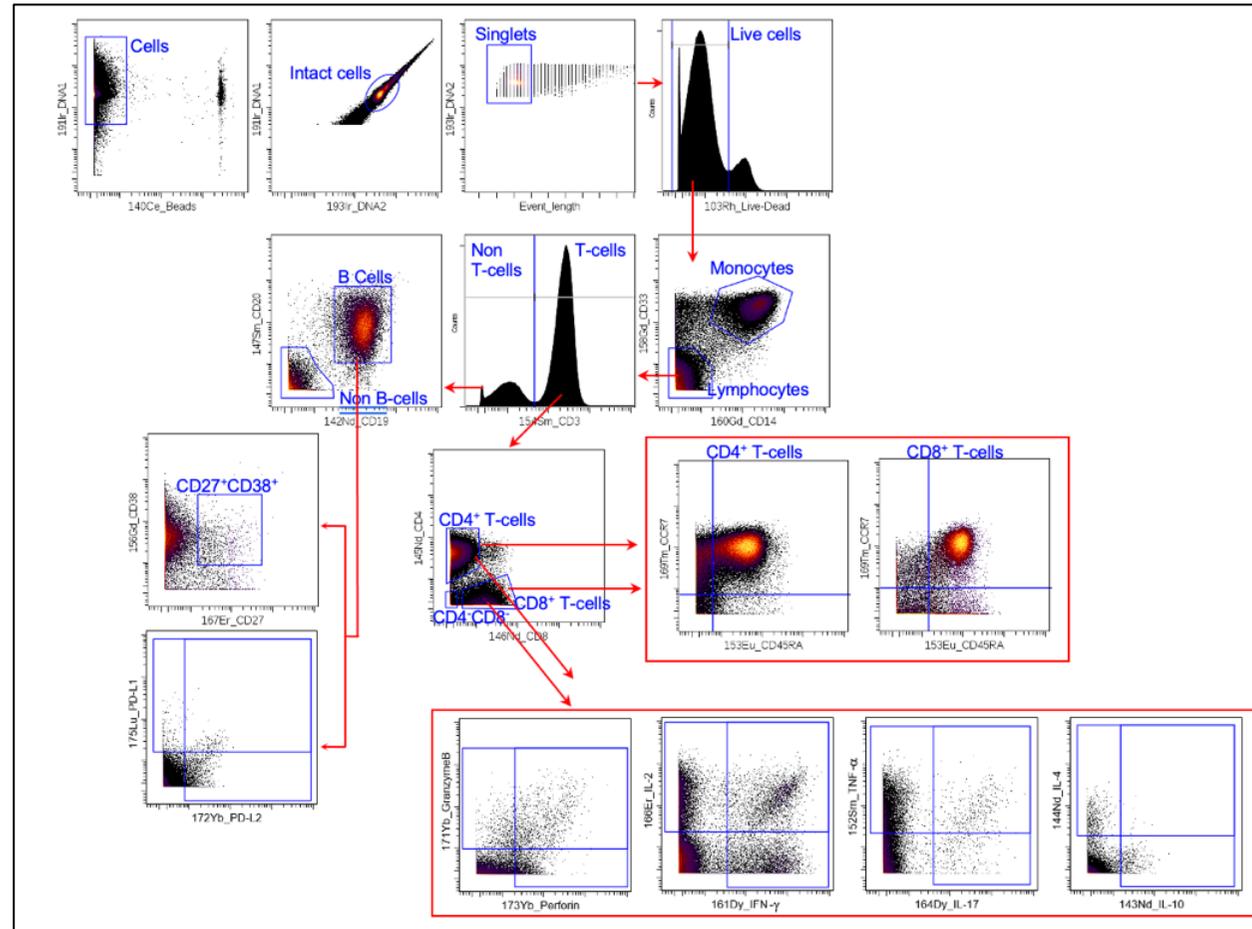


Figura 10 – Estratégia de análise para avaliação de biomarcadores fenotípicos e funcionais antígeno-específica para FA por citometria de massa (CyTOF). FONTE: elaborado pelo autor.

4.3.10 Análise de mediadores solúveis em amostras de soro e sobrenadante de cultura por Luminex

O perfil de mediadores solúveis foi determinado pelo Luminex xMAP no *The Human Immune Monitoring Center* (HIMC) da Stanford University.

Para a análise de mediadores solúveis em amostras de soro, foram utilizados kits EMD Millipore Corporation (Burlington, MA) para análise simultânea de 76 mediadores solúveis, incluindo citocinas (GM-CSF, IFN α 2, IFN- γ , TNF α , IL-1Ra, IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-13, IL-28A, LIF, MIF, SCF, TSLP, Trail, TNF- β , IL-1 α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-33), quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL22, CXCL8, CXCL10, CX3CL1, GRO α , CXCL5, CXCL9, CXCL12, CXCL13, CCL1, CCL11, CCL13, CCL15, CCL17, CCL21, CCL24, CCL26, CCL27), fatores de crescimento (FGF- β , FLT-3L, HGF, TGF α , EGF, G-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, VEGF-a) e outros (Resistin, TPO, Leptin, sCD40L, sICAM1, sVCAM-1, sFAS, sFASL, PAI-1).

Para a análise de mediadores solúveis em amostras de sobrenadante de cultura, foram utilizados kits EMD Millipore Corporation (Burlington, MA) para análise simultânea de 43 mediadores solúveis, incluindo citocinas (GM-CSF, IFN α 2, IFN- γ , TNF α , TNF- β , IL-1Ra, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-18, IL-22), quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL11, CCL22, CX3CL1, CXCL8, CXCL10, GRO α ,), fatores de crescimento (FGF- β , FLT-3L, TGF α , EGF, G-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, VEGF-a) e outros (sCD40L).

Os kits foram utilizados conforme recomendações do fabricante com algumas modificações. De forma resumida, as amostras foram incubadas *overnight* com as esferas magnéticas (*beads*) ligadas a anticorpos em uma placa de 96 poços a 4°C sob agitação orbital (500-600rpm). Após incubação, as placas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem em uma lavadora automática Biotek ELx405. Em seguida, as placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo de detecção biotilado. Logo após, foi adicionado estreptavidina-PE e as placas foram incubadas por 30 minutos sob agitação. Após incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem em uma lavadora automática Biotek ELx405 e posteriormente foi adicionado PBS para leitura no equipamento Luminex FlexMap3D com um limite inferior de 50 *beads* por amostra por marcador solúvel. Foi realizada

duplicata para cada amostra. As *beads* de controle (Chex) utilizadas foram adquiridas pela Radix Biosolutions (Georgetown, TX) e foram adicionadas a todos os poços.

4.4 Análise dos dados

Múltiplas estratégias de análise estatística convencional foram empregadas para a análise dos dados utilizando o software GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A análise comparativa entre a reatividade de anticorpos para Flavivírus (título médio geométrico, TMG) e as taxas de soropositividade (proporção, %) foi realizada pelo teste t-student e teste Qui-quadrado, respectivamente.

Para a análise de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA, foi calculado o índice das culturas (impacto da estimulação antigênica 17DD *in vitro*), o qual consiste na razão do percentual de células na cultura estimulada dividido pelo percentual de células na cultura controle (CE/CC).

O teste Mann-Whitney foi realizado para análise comparativa dos biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória. A análise comparativa múltipla foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para comparações pareadas. Em todos os casos, as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

As assinaturas ascendentes de biomarcadores foram construídas a partir do cálculo inicial do índice das culturas (CE/CC). Em seguida, foi calculada a mediana global de cada fenótipo celular para a categorização dos indivíduos com baixo índice ou alto índice, quando abaixo ou acima da mediana global, respectivamente. A seguir, as assinaturas ascendentes de biomarcadores obtidas de cada grupo foram empregadas em ordem ascendente e ressaltados os biomarcadores com mais de 50% dos indivíduos acima do ponto de corte (mediana global).

Para a análise de intersecção pelo Diagrama de Veen, foi utilizado o software Bioinformatics & Evolutionary Genomics, disponível em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. A análise foi realizada para identificar biomarcadores comuns e seletivos entre os grupos.

O perfil individual dos biomarcadores fenotípicos e funcionais, bem como dos mediadores solúveis no soro foram avaliados a partir do teste Mann-Whitney para análise comparativa. As diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

A caracterização do perfil dos mediadores solúveis no soro foi determinada a partir do cálculo das alterações do baseline, calculado pela razão do valor em pg/mL ou intensidade média de fluorescência (IMF) no D30-45 dividido pelo valor em pg/mL ou IMF no D0. Em seguida, foi calculada a mediana global de cada mediador solúvel para construção do *Heatmap* e gráficos de dispersão com barra.

Para a cinética dos mediadores solúveis em sobrenadante de cultura, foi calculado o índice das culturas (CE/CC) no tempo 0 (T0), tempo 2 (T2), tempo 4 (T4) e tempo 6 (tempo 6) após cultura. Em seguida, foi calculada a razão D30-45/D0 dos valores de índice (CE/CC). Também foram realizadas as assinaturas ascendentes dos mediadores solúveis a partir do cálculo da razão D30-45/D0 dos valores de índice (CE/CC).

A análise dos dados de correlação foi explorada por meio de redes integrativas e matrizes de correlação. Para isso, foi utilizado o software Cytoscape, uma plataforma de código aberto (disponível em <https://cytoscape.org>). Para cada grupo, foram construídos *clusters* de mediadores.

A análise das populações celulares por tSNE foi realizada no software R por estratégia de seleção supervisionada. Para redução da dimensionalidade, os arquivos fcs foram carregados no ambiente de programação R através do pacote Flowcore. Os valores de intensidade de expressão foram transformados pela função de arco-seno hiperbólico (arcsinh) e os mesmos foram exportados em arquivos csv. Para representação gráfica, foi utilizado o algoritmo tSNE (*T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*) implementado pelo pacote Rtsne no ambiente de programação R. O algoritmo foi ajustado com valores de perplexidade 30 para CD4⁺ e células B e 50 para células T CD8⁺. Foram realizadas 5.000 iterações utilizando como parâmetros de clusterização os marcadores CD3, CD4 ou CD8, CD45RA, CD27 e CCR7 para as células T e CD19, CD20, CD21, IgD e CD27 para as células B. Os hiperparâmetros tSNE_x e tSNE_y foram visualizados utilizando o pacote ggplot2, na forma de mapas de calor (*heatmaps*).

5 RESULTADOS

Parte dos resultados deste estudo foram previamente publicados por Reis e colaboradores em 2021. No entanto, para maior detalhamento, os mesmos serão apresentados nesta seção (REIS et al., 2021).

5.1 Impacto da imunidade prévia para Flavivírus (FA, DENGUE e ZIKA) na resposta celular específica para FA em indivíduos residentes em áreas sem circulação do vírus amarelo após a vacinação com a dose padrão da vacina 17DD

5.1.1 Status sorológico para Flavivírus (FA, DENGUE e ZIKA) na linha de base do estudo

A sorologia para FA, DENGUE e ZIKA foi determinada para avaliar a imunidade humoral pré-existente para Flavivírus em Crianças (9^{Meses}-4^{Anos}) e Adultos (18-49^{Anos}) residentes em áreas sem circulação do vírus amarelo. Os resultados estão apresentados na Figura 11.

Os resultados demonstraram níveis mais elevados de anticorpos neutralizantes para FA, DENGUE IgG e ZIKA IgG em Adultos (18-49^{Anos}) comparado a Crianças (9^{Meses}-4^{Anos}). Além disso, as taxas de soropositividade para FA, DENGUE e ZIKA foram mais altas (26%; 87%; 67% vs 6%; 13%; 15%, respectivamente) em Adultos (18-49^{Anos}) em comparação com as Crianças (9^{Meses}-4^{Anos}).

Figura 11 - Sorologia para Flavivírus na linha de base do estudo

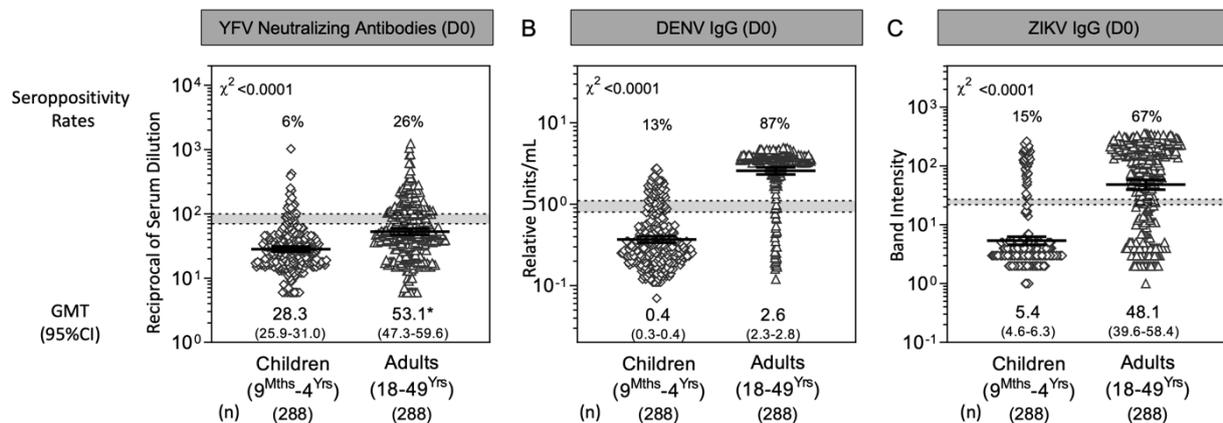


Figura 11 – Sorologia para Flavivírus na linha de base do estudo. (A) Anticorpos neutralizantes específicos de FA μ PRN-HRP, (B) DENGUE IgG e (C) ZIKA IgG foram avaliados em Crianças (9^{Meses-4Anos})/(\diamond) e Adultos (18-49^{Anos})/(\triangle) na linha de base (D0). Anticorpos neutralizantes específicos de FA foram determinados pelo teste *Micro Plaque Reduction Neutralization – Horseradish Peroxidase* (μ PRN-HRP), conforme descrito na metodologia. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da última diluição do soro que reduziu o número de placas de lise em 50% (EP₅₀) em comparação com o controle. A taxa de soropositividade foi calculada considerando o título de anticorpos ≥ 100 como ponto de corte. Resultados ≤ 70 foram considerados negativos e aqueles entre 71 e 99 constituem a zona cinza indeterminada. DENGUE IgG foram determinados por meio do kit ELISA comercialmente disponível, conforme descrito na metodologia. Os resultados foram expressos em Unidades Relativas/mL. As taxas de soropositividade foram calculadas considerando os níveis de anticorpos $> 1,1$ como ponto de corte. Resultados $< 0,80$ foram considerados negativos e aqueles entre 0,80 e 1,1 compreendem a zona cinza indeterminada. ZIKA IgG foram determinados pelo teste rápido comercialmente disponível, conforme descrito na metodologia. Os resultados foram expressos como intensidade de banda. As taxas de soropositividade foram calculadas considerando a intensidade da banda > 27 como ponto de corte. Resultados < 22 foram considerados negativos e aqueles entre 22 e 27 compõem a zona cinza indeterminada. Os dados foram apresentados como dispersão de valores individuais e título médio geométrico mais intervalo de confiança de 95% (TMG, IC95%) para Crianças (9^{Meses-4Anos}). E Adultos (18-49^{Anos}) na linha de base (D0). As taxas de soropositividade também estão fornecidas na figura. Em todos os casos, as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$, as quais foram destacadas por “**” para comparação com Crianças (9 meses-4 anos). FONTE: REIS et al., 2021.

5.1.2 Impacto do status sorológico prévio para Flavivírus na resposta celular específica para FA após vacinação antiamarílica 17DD

A fim de verificar se o status da sorologia para Flavivírus na linha de base do estudo está associado a um padrão distinto de células específicas de FA antes da vacinação antiamarílica 17DD, os indivíduos foram classificados de acordo com o status sorológico negativo ou positivo para FA, DENGUE e ZIKA (- ou +) e a resposta celular antígeno-específico para FA foi avaliada antes da vacinação antiamarílica 17DD. Os resultados estão representados na Figura 12.

A análise dos dados demonstrou que a sorologia positiva para todos os três Flavivírus está associada a níveis mais baixos de células NCD8 e CMCD8, mas a níveis mais elevados de células eEfCD19. Além disso, a soropositividade pré-existente para FA está relacionada a níveis mais elevados de NCD4, EMCD8, IFN-

MCD8, NCD19 e nCMCD19 na linha de base do estudo em comparação com participantes com status soronegativo para FA, bem como para DENGUE ou ZIKA.

Figura 12 - Sorologia para Flavivírus e resposta celular específica para FA na linha de base do estudo

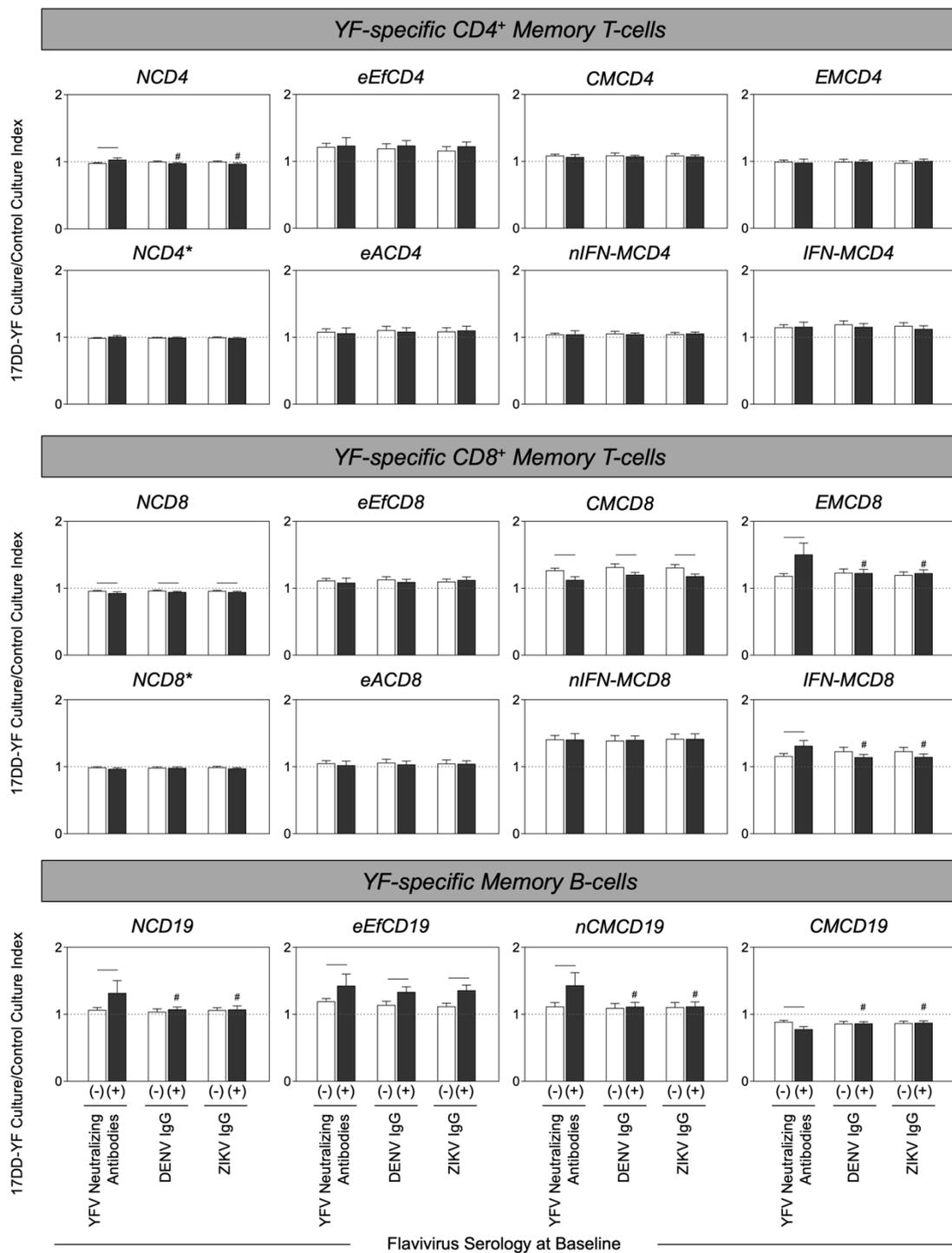


Figura 12 – Sorologia para Flavivírus e resposta celular específica para FA na linha de base do estudo. A resposta celular específica de FA foi avaliada em indivíduos com idades entre 9 meses e 49 anos na

linha de base do estudo (D0). A resposta celular específica de FA foi avaliada a partir da cultura *in vitro* antígeno-específica de longa duração de PBMC obtidas a partir de coágulo sanguíneo seguido pela marcação de moléculas de superfície e aquisição no citômetro de fluxo, conforme descrito na metodologia. Os resultados foram expressos em índice das culturas observados em indivíduos com idades entre 9 meses e 49 anos considerando o impacto do status da sorologia de FA μ PRN-HRP (-/□ vs (+)/■, DENGUE IgG (-/□ vs (+)/■ e ZIKA IgG (-/□ vs (+)/■ na memória de células T CD4⁺ (A), T CD8⁺ (B) e células B (C). Foi considerado como ponto de corte índice=1, representado pela linha tracejada. Características fenotípicas de células T foram avaliadas, incluindo: naïve (N = CD27⁺/CD45RO⁻), *early effector* (eEf = CD27⁻/CD45RO⁻), memória central (CM = CD27⁺/CD45RO⁺), memória efetora (EM = CD27⁻/CD45RO⁺), naïve* (N* = CD183⁻/CD45RO⁻), *early activated* (eA = CD183⁺/CD45RO⁻), memória não mediada por interferon (nIFN-M = CD183⁻/CD45RO⁺), memória mediada por interferon (IFN-M = CD183⁺/CD45RO⁺). Características fenotípicas de células B também foram avaliadas, incluindo: naïve (N = CD19⁺/CD27⁺/IgD⁺), *early effector* (eEf = CD19⁺/CD27⁻/IgD⁻), memória não clássica (nCM = CD19⁺/CD27⁺/IgD⁺) e memória clássica (CM = CD19⁺/CD27⁺/IgD⁻). A análise comparativa entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Em todos os casos, as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$, as quais foram destacadas por linhas de conexão e “#” para comparações intragrupo e intergrupo, respectivamente. FONTE: REIS et al., 2021.

5.2 Influência da idade na produção de anticorpos neutralizantes e biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA em indivíduos residentes em áreas sem circulação do vírus amarelo após a primovacinação com a dose padrão da vacina 17DD

5.2.1 Análise da produção de anticorpos neutralizantes para FA

Os títulos de anticorpos neutralizantes específicos para FA e a taxa de soropositividade foram avaliados em Crianças mais novas ($9^{\text{Meses-2Anos}}$), Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$) e Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$) antes da vacinação (D0), bem como no dia 30-45 (D30-45) e 365 (D365) após a primovacinação anti-amarela 17DD. Os resultados estão apresentados na Figura 13.

Os resultados demonstraram que a primovacinação anti-amarela 17DD induz um aumento dos níveis de anticorpos neutralizantes específicos para a FA no D30-45 com uma redução subsequente no D365, independentemente da faixa etária. Além disso, os níveis de anticorpos neutralizantes foram mais elevados em Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$) no D30-45 em comparação com Crianças mais novas ($9^{\text{Meses-2Anos}}$). No D365, os níveis de anticorpos neutralizantes foram maiores em adultos em comparação com os dois

subgrupos de crianças. De forma geral, a taxa de soropositividade em Crianças mais novas ($9^{\text{Meses-2Anos}}$), Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$) e Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$) atingem níveis semelhantes no D30-45 (94%, 95% e 100%, respectivamente), porém uma diminuição substancial foi relatada no D365, particularmente em crianças mais novas, em comparação com os outros subgrupos (87%, 96% e 99%, respectivamente).

Figura 13 - Influência da idade na produção de anticorpos neutralizantes para FA após a primovacinação antiamarílica 17DD

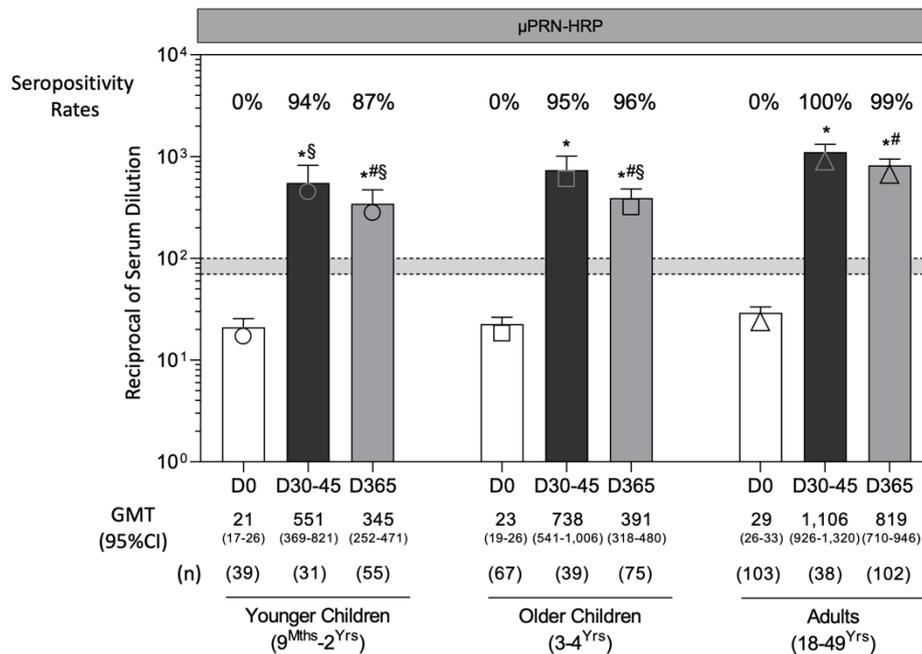


Figura 13 – Influência da idade na produção de anticorpos neutralizantes para FA após a primovacinação antiamarílica 17DD. Anticorpos neutralizantes específicos para FA foram avaliados em Crianças mais novas ($9^{\text{Meses-2Anos}}$)/(○;●;●), Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$)/(□;■;■) e Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$)/(△;▲;▲) antes da vacinação (D0), no dia 30-45 (D30-45) e no dia 365 (D365) após a primovacinação antiamarílica 17DD. Anticorpos neutralizantes específicos para FA foram determinados pelo teste *Micro Plaque Reduction Neutralization – Horseradish Peroxidase* (μ PRN-HRP), conforme descrito na metodologia. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da última diluição do soro que reduziu o número de placas de lise em 50% (EP_{50}) em comparação com o controle. A taxa de soropositividade foi calculada considerando o título de anticorpos ≥ 100 como ponto de corte. Resultados ≤ 70 foram considerados negativos e aqueles entre 71 e 99 constituem a zona cinza indeterminada. Os dados foram apresentados como dispersão de valores individuais e título médio geométrico mais intervalo de confiança de 95% (TMG, IC95%) para Crianças mais novas ($9^{\text{Meses-2Anos}}$), Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$) e Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$). A análise comparativa das taxas de reatividade e soropositividade dos anticorpos foi realizada por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas e teste Qui-quadrado, respectivamente. Em todos os casos, as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$ e destacadas por “*”, “#” para comparação intragrupo

com D0 e D30-45 e “§” para comparação intergrupo com Adultos (18-49^{Anos}), respectivamente. FONTE: REIS et al., 2021.

5.2.2 Análise de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA

A análise de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória para FA foi realizada a partir da cultura *in vitro* antígeno-específica de longa duração de PBMC, obtidas a partir de coágulo sanguíneo, de Crianças mais novas (9^{Meses}-2^{Anos}), Crianças mais velhas (3-4^{Anos}) e Adultos (18-49^{Anos}) antes da vacinação (D0), bem como no dia 30-45 (D30-45) e 365 (D365) após a primovacinação antiamarílica 17DD. Os resultados estão apresentados nas Figuras 14 e 15.

A análise dos dados demonstrou que, independentemente da faixa etária, a primovacinação antiamarílica 17DD induz um aumento de células eEfCD4 e IFN-MCD8 nos tempos D30-45 e D365 em comparação com o D0. Além disso, um aumento de células EMCD4 foi observado em todos os subgrupos no D30-45, retornando aos níveis basais no D365. Por outro lado, todos os subgrupos exibiram uma diminuição persistente de células eEfCD8 e CMCD8 no D30-45 e D365 em comparação com o D0. Particularmente, uma diminuição de nIFN-MCD4 foi observada em Crianças mais novas (9^{Meses}-2^{Anos}) no D365 em comparação com Crianças mais velhas (3-4^{Anos}) e Adultos (18-49^{Anos}). Diferenças nas células NCD4 e NCD8 foram observadas exclusivamente em adultos em comparação com os dois subgrupos de crianças. Além disso, a primovacinação antiamarílica 17DD induziu um aumento de células EMCD8 em todos os subgrupos no D30-45. No entanto, apenas o grupo de Crianças mais novas (9^{Meses}-2^{Anos}) apresentaram um declínio posterior de células EMCD8 no D365 (Figura 13).

Figura 14 - Influência da idade nos biomarcadores fenotípicos de células T de memória antígeno-específica para FA após a primovacinação antiamarilica 17DD

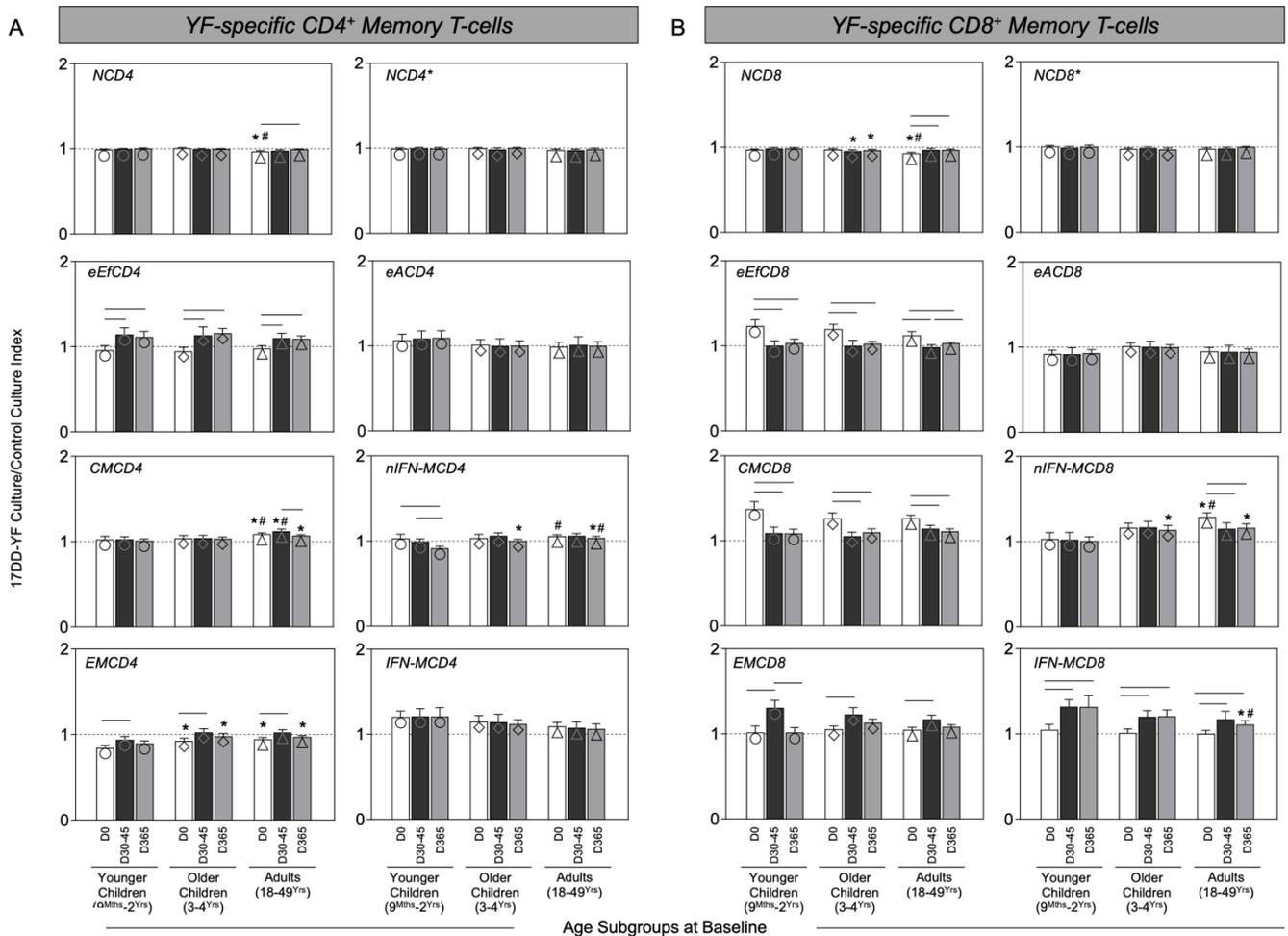


Figura 14 – Influência da idade nos biomarcadores fenotípicos de células T de memória antígeno-específica para FA após a primovacinação antiamarilica 17DD. A análise de biomarcadores fenotípicos de células T de memória antígeno-específica para FA foi avaliada em Crianças mais novas (9^{Meses}-2^{Anos})/(○; ●; ◐); Crianças mais velhas (3-4^{Anos})/(□; ■; ▒) e Adultos (18-49^{Anos})/(△; ▲; ▴) antes da vacinação (D0), no dia 30-45 (D30-45) e no dia 365 (D365) após a primovacinação antiamarilica 17DD. A resposta celular específica de FA foi avaliada a partir da cultura *in vitro* antígeno-específica de longa duração de PBMC obtidas a partir de coágulo sanguíneo seguido pela marcação de moléculas de superfície e aquisição no citômetro de fluxo, conforme descrito na metodologia. Os resultados foram expressos em índice das culturas observados em Crianças mais novas (9^{Meses}-2^{Anos}), Crianças mais velhas (3-4^{Anos}) e Adultos (18-49^{Anos}) para avaliar a influência da idade nos biomarcadores fenotípicos de células T de memória CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B). Foi considerado como ponto de corte índice=1, representado pela linha tracejada. Características fenotípicas de células T foram avaliadas, incluindo: naïve (N = CD27⁺/CD45RO⁻), *early effector* (eEf = CD27⁺/CD45RO⁻), memória central (CM = CD27⁺/CD45RO⁺), memória efetora (EM = CD27⁻/CD45RO⁺), naïve* (N* = CD183⁻/CD45RO⁻), *early activated* (eA = CD183⁺/CD45RO⁻), memória não mediada por interferon (nIFN-M = CD183⁻/CD45RO⁺), memória mediada por interferon (IFN-M = CD183⁺/CD45RO⁺). A análise comparativa entre os subgrupos foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis

seguido pelo pós-teste de Dunn para comparação múltipla. Em todos os casos, as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$ e destacadas por linhas de conexão, “*” ou “#” para comparação intragrupo e análise comparativa com crianças (9^{Meses}-2^{Anos}) e crianças (3-4^{Anos}), respectivamente. FONTE: REIS et al., 2021.

A análise de biomarcadores fenotípicos de células B de memória para FA demonstrou que todos os subgrupos apresentaram níveis aumentados de células nCMCD19 no D30-45 em comparação com D0, com declínio progressivo no D365 (Figura 15).

Figura 15 - Influência da idade nos biomarcadores fenotípicos de células B de memória antígeno-específica para FA após a primovacinação anti-amarela 17DD

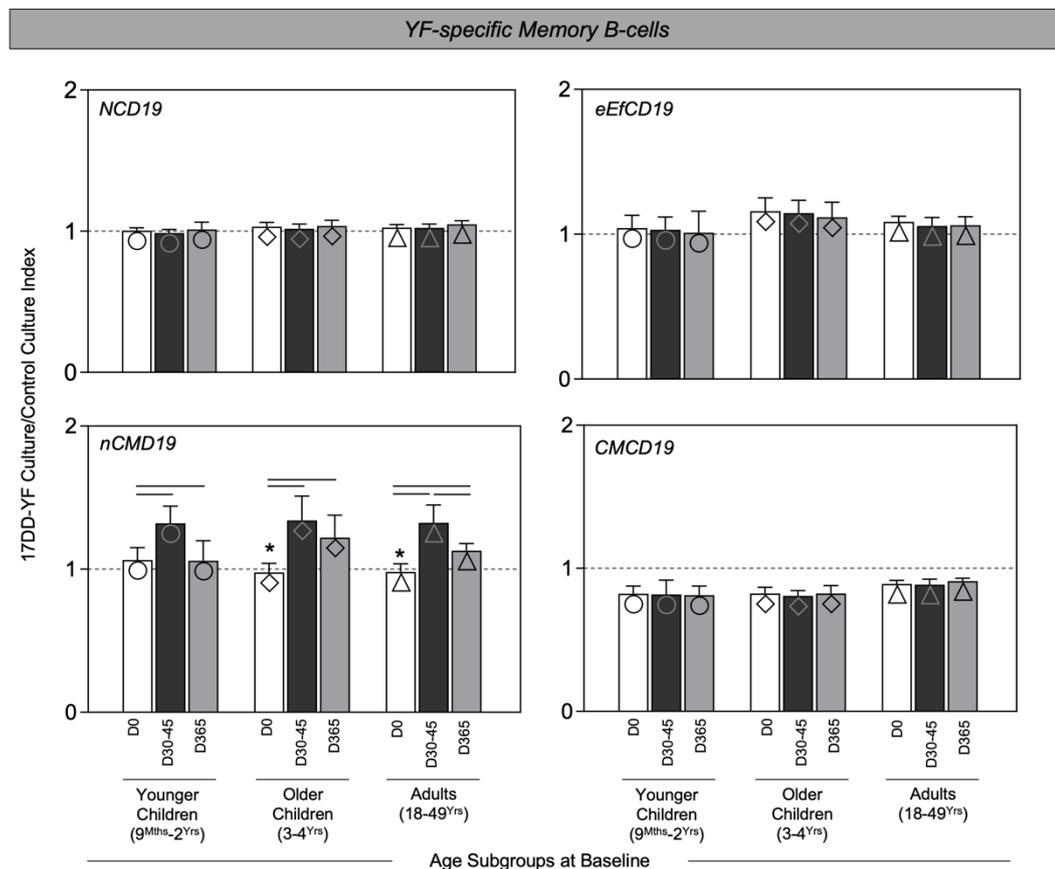


Figura 15 – Influência da idade nos biomarcadores fenotípicos de células B de memória antígeno-específica para FA após a primovacinação anti-amarela 17DD. A análise de biomarcadores fenotípicos de células B de memória antígeno-específica para FA foi avaliada em Crianças mais novas (9^{Meses}-2^{Anos})/(○;●;◐), Crianças mais velhas (3-4^{Anos})/(□;■;◑) e Adultos (18-49^{Anos})/(△;▲;◒) antes da vacinação (D0), no dia 30-45 (D30-45) e no dia 365 (D365) após a primovacinação anti-amarela 17DD. A resposta celular específica de FA foi avaliada a partir da cultura *in vitro* antígeno-específica de longa duração de PBMC obtidas a partir de coágulo sanguíneo seguido pela marcação de moléculas de

superfície e aquisição no citômetro de fluxo, conforme descrito na metodologia. Os resultados foram expressos em índice das culturas observados em Crianças mais novas ($9^{\text{Meses-2Anos}}$), Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$) e Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$) para avaliar a influência da idade nos biomarcadores fenotípicos de células B de memória. Foi considerado como ponto de corte índice=1, representado pela linha tracejada. Características fenotípicas de células B também foram avaliadas, incluindo: naïve (N = $CD19^+/CD27^-/IgD^+$), *early effector* (eEf = $CD19^+/CD27^-/IgD^-$), memória não clássica (nCM = $CD19^+/CD27^+/IgD^+$) e memória clássica (CM = $CD19^+/CD27^+/IgD^-$). A análise comparativa entre os subgrupos foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn para comparação múltipla. Em todos os casos, as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$ e destacadas por linhas de conexão, “*” ou “#” para comparação intragrupo e análise comparativa com Crianças mais novas ($9^{\text{Meses-2Anos}}$) e Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$), respectivamente. FONTE: REIS et al., 2021.

5.2.3 Influência da idade na assinatura de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA

As assinaturas ascendentes de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA foram construídas para os grupos de Crianças mais novas ($9^{\text{Meses-2Anos}}$), Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$) e Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$) antes da vacinação (D0), bem como no dia 30-45 (D30-45) e 365 (D365) após a primovacinação antiamarílica 17DD. Para isso, os resultados foram convertidos em dados categóricos (baixo ou alto índice) e a proporção de indivíduos com alto índice foi reunida em curvas ascendentes. Os biomarcadores que atingiram mais de 50% dos indivíduos acima da mediana global foram destacados como características de cada subgrupo. Os resultados estão apresentados na Figura 16.

A análise dos dados demonstraram que após a primovacinação antiamarílica 17DD, todos os grupos etários apresentaram um aumento na proporção de indivíduos com alto índice de células EMCD8, IFN-MCD8 e nCMCD19 no D30-45 em comparação com o D0. Além disso, todos os subgrupos apresentaram proporção aumentada de indivíduos com alto índice de células eEfCD4 e INF-MCD8. Adicionalmente, foi observado que apenas o grupo de Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$) e Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$) persistiram com alto índice de EMCD8 no D365.

Figura 16 – Assinatura ascendente de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica após a primovacinação antiamarilica 17DD

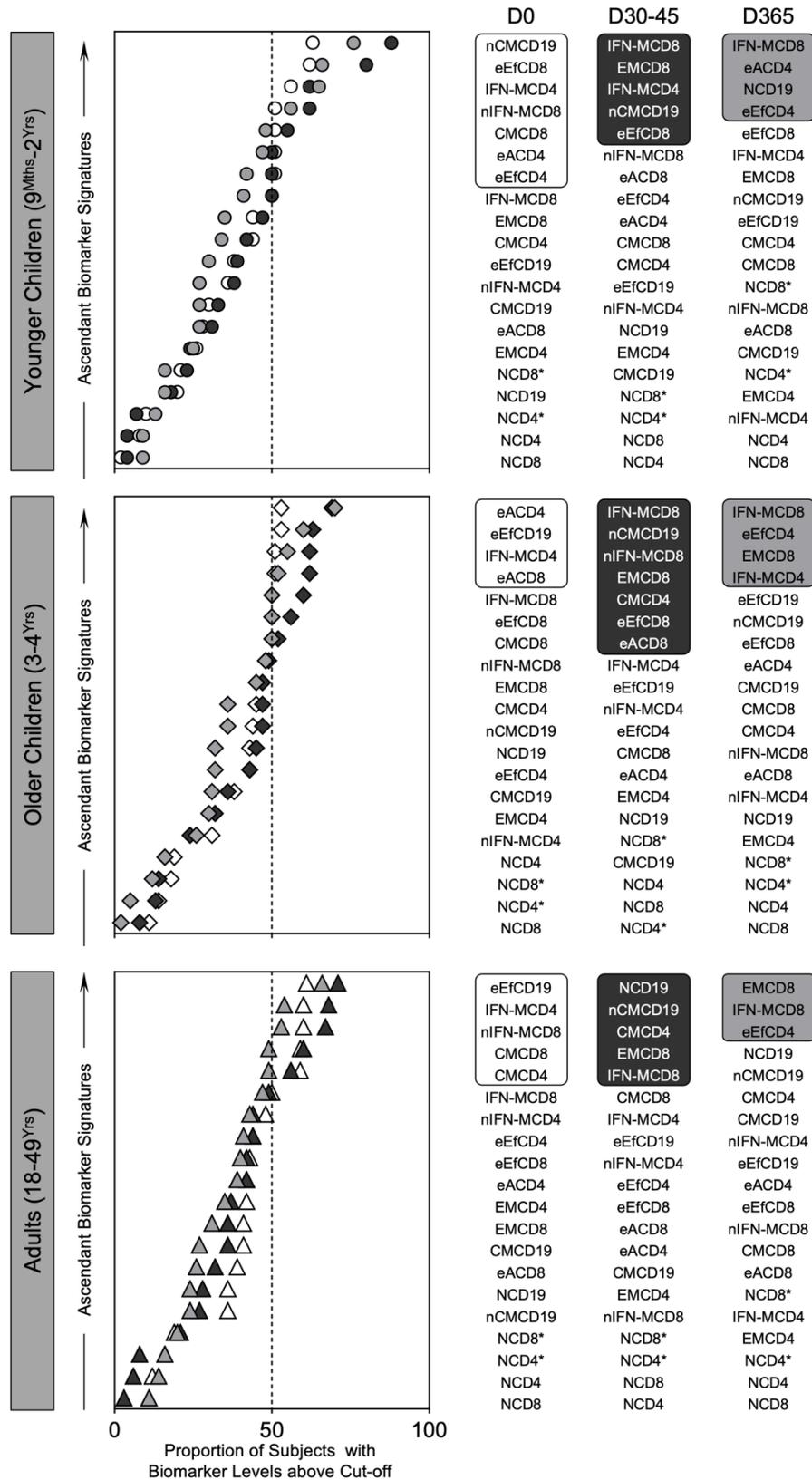


Figura 16 – Assinatura ascendente de biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica após a primovacinação antiamarilica 17DD. As assinaturas de biomarcadores

foram construídas para os grupos de Crianças mais novas ($9^{\text{Meses-2Anos}}$)/(○;●;●), Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$)/(□;■;■) e Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$)/(△;▲;▲) antes da vacinação (D0), bem como no dia 30-45 (D30-45) e 365 (D365) após a primovacinação antiamarílica 17DD. Os resultados foram expressos em índice das culturas e convertidos em dados categóricos (baixo ou alto índice) conforme descrito na metodologia. As assinaturas ascendentes de biomarcadores obtidas de cada grupo no D0, D30-45 e D365 após a primovacinação antiamarílica 17DD foram empregadas em ordem ascendente e foram ressaltados os biomarcadores com mais de 50% dos indivíduos (quadros retangulares) acima do ponto de corte (linha tracejada). As assinaturas de biomarcadores foram sobrepostas para análise comparativa entre D0, D30-45 e D365. FONTE: REIS et al., 2021.

5.2.4 Biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória antígeno-específica para FA comuns e seletivos em crianças e adultos

Análise de intersecção pelo Diagrama de Venn foi empregada para identificar biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória para FA comuns e seletivos observados em Crianças mais novas ($9^{\text{Meses-2Anos}}$), Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$) e Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$) antes da vacinação (D0), bem como no dia 30-45 (D30-45) e 365 (D365) após a primovacinação antiamarílica 17DD. Os resultados estão apresentados na Figura 17.

Os Diagramas de Venn ilustraram as principais diferenças observadas entre os subgrupos etários. A análise comparativa entre os grupos demonstrou que as Crianças mais novas ($9^{\text{Meses-2Anos}}$) apresentam um perfil de células IFN-MCD8 aumentado em D30-45 e D365, enquanto altos níveis de células EMCD8 foram restritas apenas ao D30-45 e perdidas no D365. As Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$) e Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$) exibiram uma resposta mais robusta à primovacinação antiamarílica 17DD com células IFN-MCD8 e EMCD8 persistentemente aumentadas no D30-45 e D365 (Figura 17A).

A análise comparativa entre os subgrupos em momentos específicos após a primovacinação antiamarílica 17DD ressalta ainda que EMCD8, IFN-MCD8 e nCMCD19 em D30-45 e eEfCD4 e IFN-MCD8 em D365 são biomarcadores universais encontrados em todos os subgrupos. Notavelmente, apenas Crianças mais velhas ($3-4^{\text{Anos}}$) e Adultos ($18-49^{\text{Anos}}$) apresentaram o biomarcador EMCD8 até o D365.

Figura 17 – Biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória para FA comuns e seletivos observados após a primovacinação antiamarilica 17DD

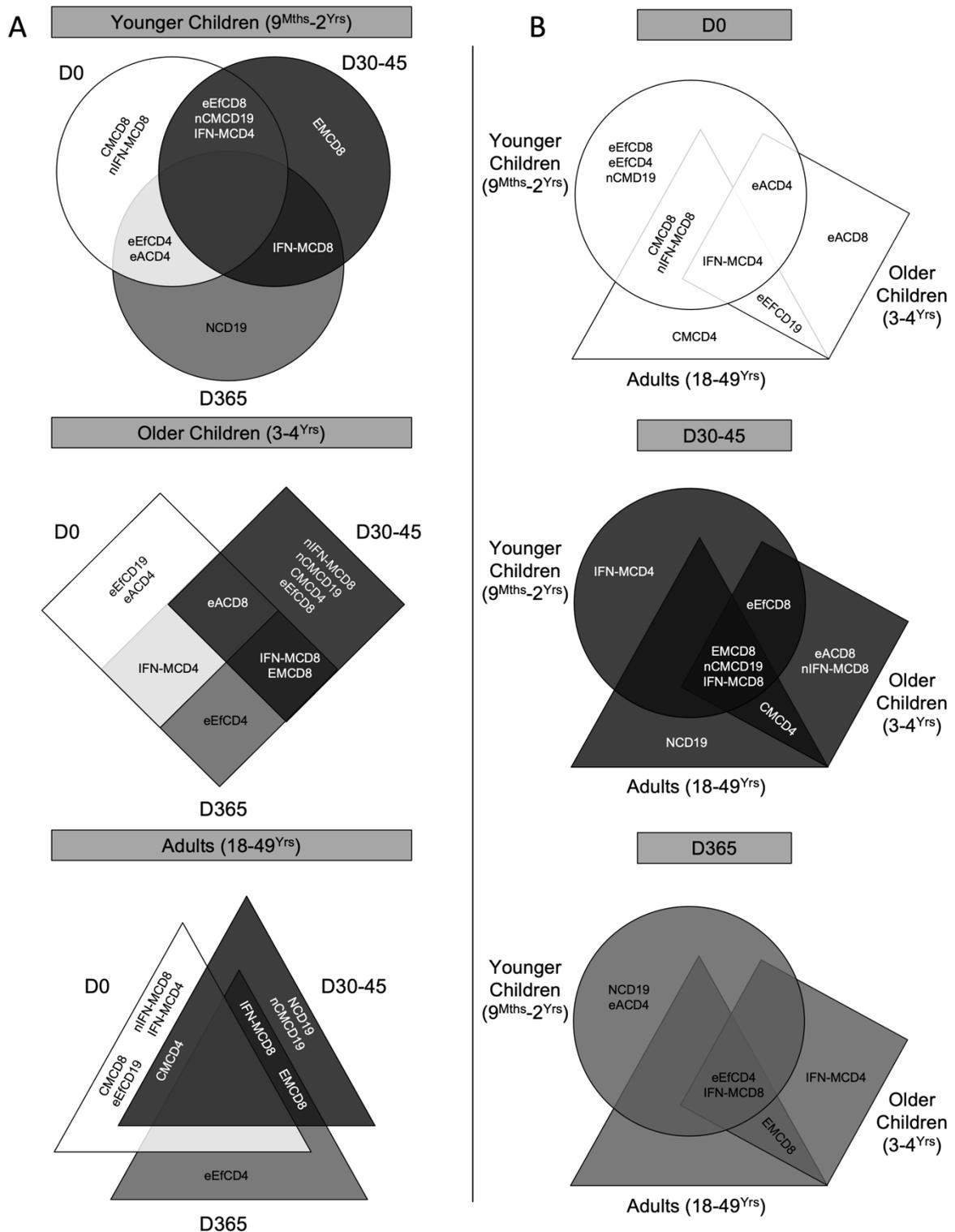


Figura 17 – Biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória para FA comuns e seletivos observados após a primovacinação antiamarilica 17DD. Análise de intersecção pelo Diagrama de Venn foi empregada para identificar biomarcadores fenotípicos de células T e B de memória para FA comuns e seletivos observados entre diferentes tempos (A) e subgrupos etários (B) após a primovacinação

antiamarilica 17DD. Biomarcadores comuns e seletivos no D0 \cap D30-45 \cap D365 em Crianças mais novas (9^{Meses-2Anos})/(○;●;◐), Crianças mais velhas (3-4^{Anos})/(□;■;◑) e Adultos (18-49^{Anos})/(△;▲;◒) estão apresentados na figura, bem como a análise descritiva dos biomarcadores comuns e seletivos observados em Crianças mais novas (9^{Meses-2Anos}) \cap Crianças mais velhas (3-4^{Anos}) \cap Adultos (18-49^{Anos}) em diferentes tempos (D0/(○,□,△), D30-45/(●,■,▲) and D365/(◐,◑,◒)). FONTE: REIS et al., 2021.

5.3 Perfil de anticorpos neutralizantes e mediadores solúveis em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarilica 17DD

5.3.1 Análise da produção de anticorpos neutralizantes para FA

Os títulos de anticorpos neutralizantes específicos para FA e a taxa de soropositividade foram avaliados em Adultos (18-57^{Anos}) antes da vacinação (D0) e no dia 30-45 (D30-45) após a primovacinação com a dose fracionada da vacina 17DD. Os resultados estão apresentados na Figura 18.

Os resultados demonstraram que a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarilica 17DD induz um aumento dos níveis de anticorpos neutralizantes específicos para a FA e da taxa de soropositividade no D30-45 (0% e 92%, respectivamente).

Figura 18 - Perfil de anticorpos neutralizantes para FA após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarilica 17DD

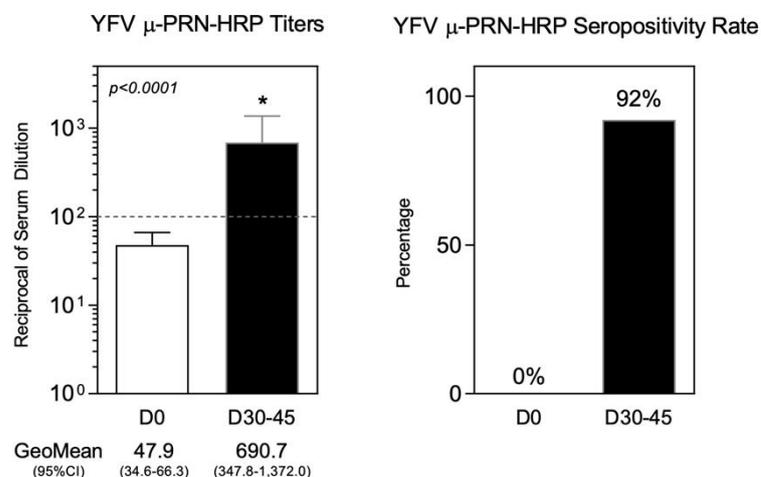


Figura 18 – Perfil de anticorpos neutralizantes para FA após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarilica 17DD. Anticorpos neutralizantes específicos de FA foram avaliados em Adultos

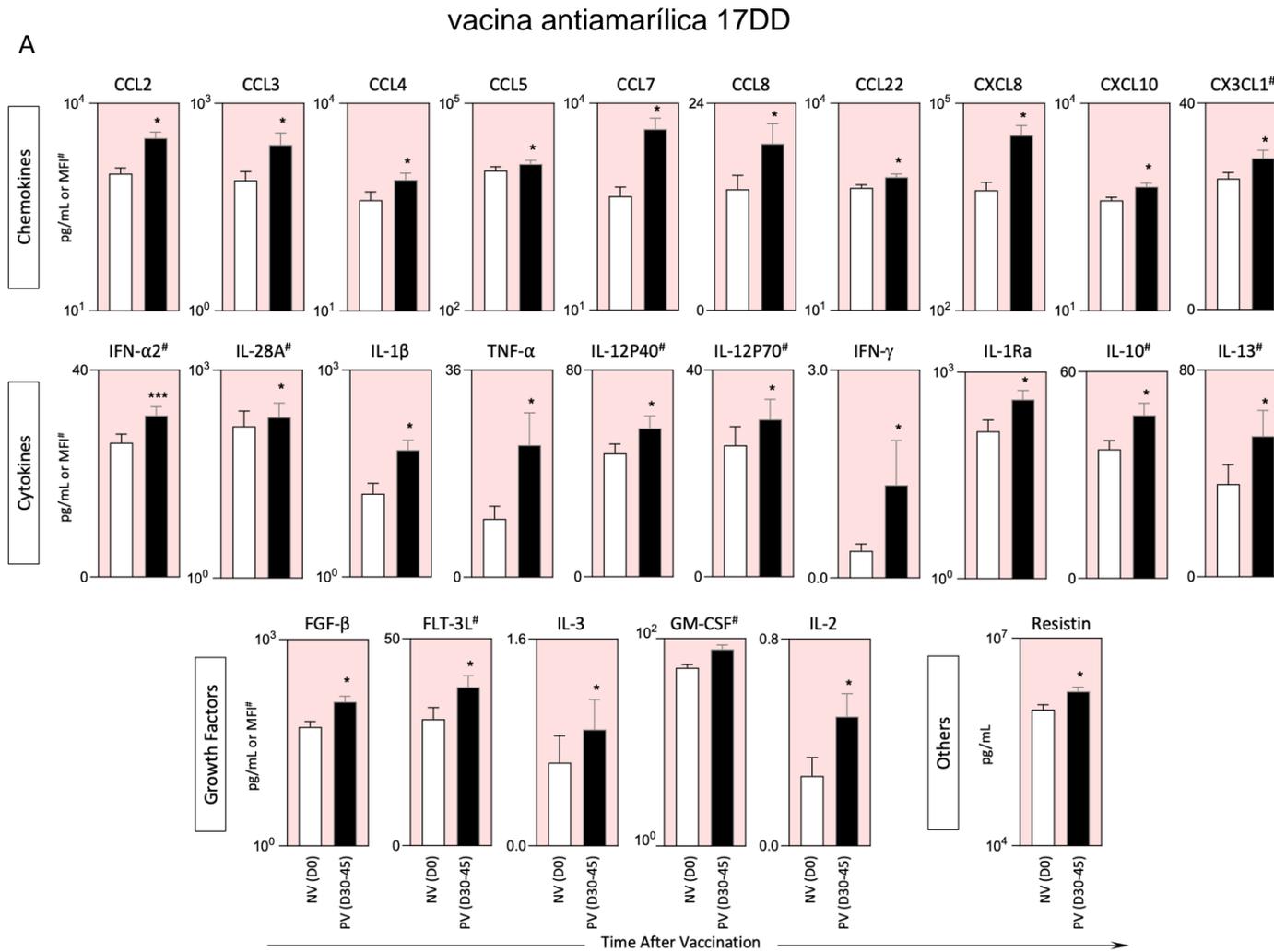
(18-57^{Anos}) primovacinados com a dose fracionada da vacina 17DD. Anticorpos neutralizantes específicos de FA foram determinados pelo teste *Micro Plaque Reduction Neutralization – Horseradish Peroxidase* (μ PRN-HRP), conforme descrito na metodologia. Os títulos de anticorpos foram expressos como a recíproca da última diluição do soro que reduziu o número de placas de lise em 50% (EP_{50}) em comparação com o controle. Os dados foram apresentados como título médio geométrico mais intervalo de confiança de 95% (TMG, IC95%) para Adultos (18-57^{Anos}). FONTE: elaborado pelo autor.

5.3.2 Análise de mediadores solúveis em amostras de soro

O perfil de mediadores solúveis em amostras de soro foi avaliado em Adultos (18-57^{Anos}) antes da vacinação (D0) e no dia 30-45 (D30-45) após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD. Os resultados estão apresentados nas Figuras 19 e 20.

A análise do perfil individual dos marcadores solúveis demonstrou que a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD induz um aumento das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL22, CXCL8, CXCL10 e CX3CL1, das citocinas IFN- α 2, IL-28A, IL-1 β , TNF- α , IL-12P40, IL-12P70, IFN- γ , IL-1Ra, IL-10 e IL-13, dos fatores de crescimento FGF- β , FLT-3L, IL-3, GM-CSF e IL-2 e da Resistina no tempo D30-45 em comparação com o D0 (Figura 19A). Os demais mediadores solúveis avaliados não sofreram alteração após a vacinação (Figura 19B).

Figura 19 - Análise de mediadores solúveis de soro em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da



B

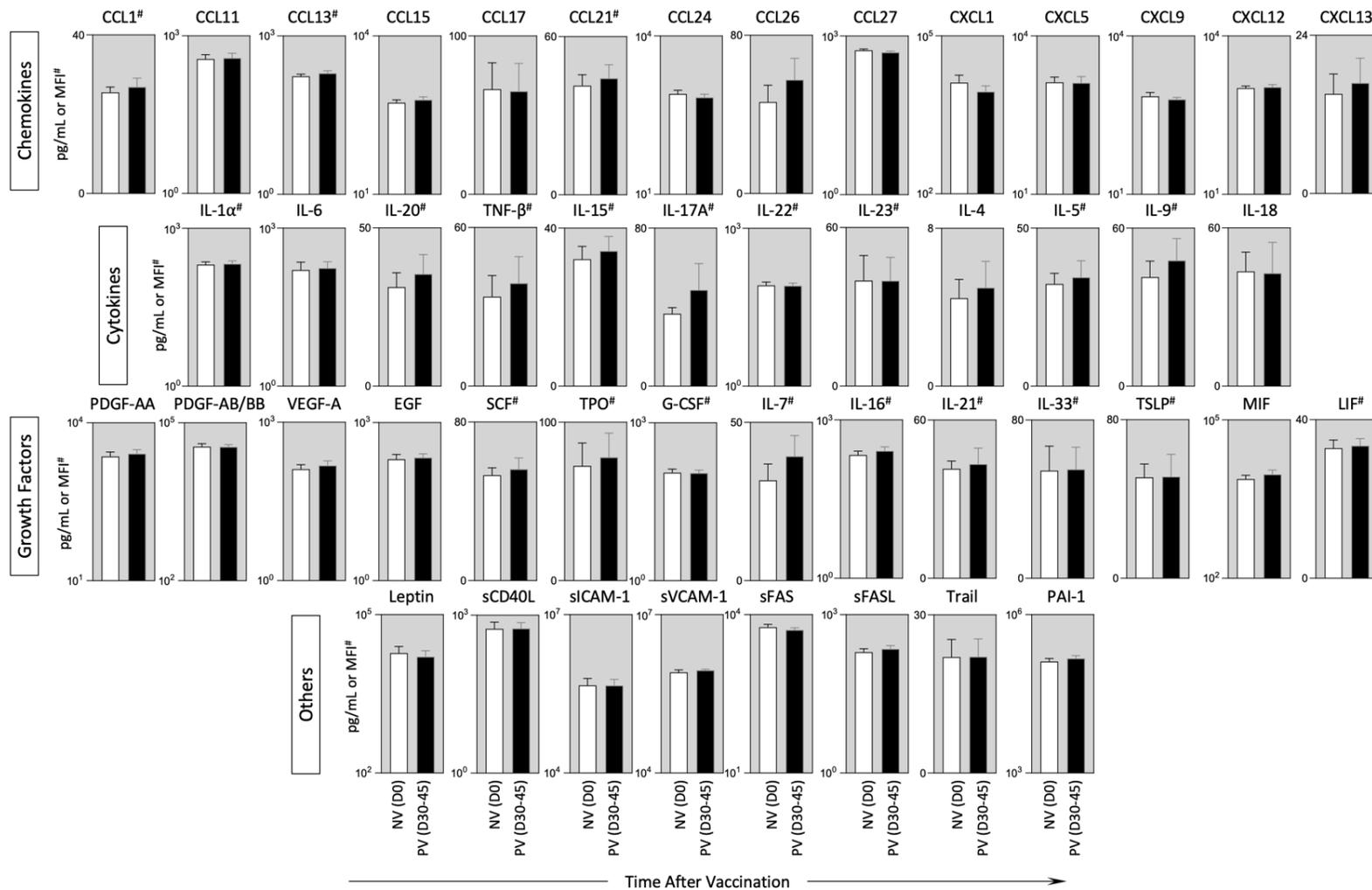
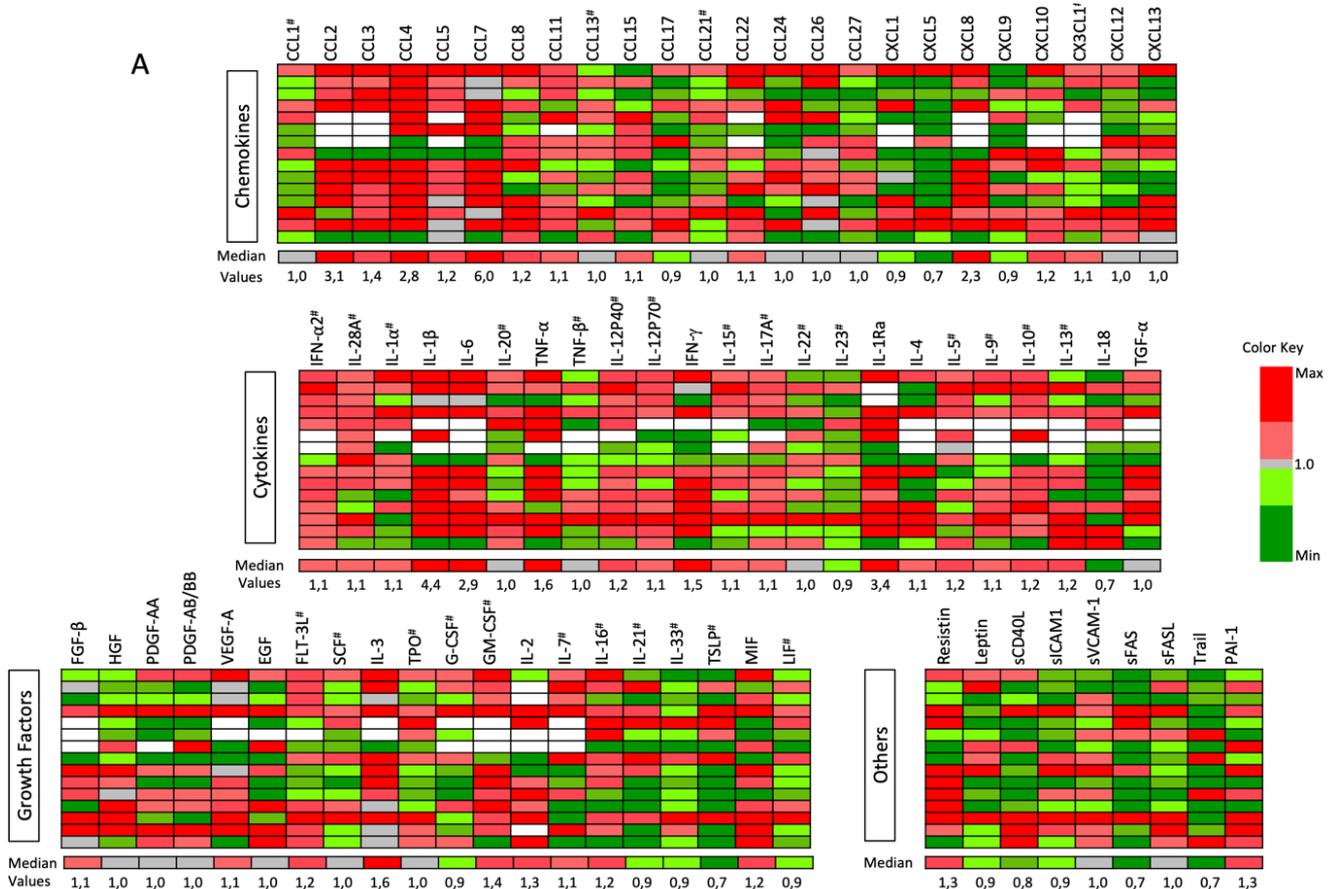


Figura 19 – Análise de mediadores solúveis de soro em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD. (A) Mediadores solúveis de soro significativos. (B) Mediadores solúveis de soro não significativos. A análise de mediadores solúveis em amostra de soro foi avaliada em Adultos (18-57^{Anos}) antes da vacinação (D0) e no dia 30-45 (D30-45) após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.

Os mediadores séricos solúveis foram avaliados a partir do Luminex, conforme descrito na metodologia. Os resultados foram expressos em pg/mL ou IMF e o teste Mann-Whitney foi utilizado para a análise comparativa. Em todos os casos, as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$. FONTE: elaborado pelo autor.

A fim de caracterizar o perfil dos mediadores solúveis de soro, foi determinada a mediana das alterações do baseline para cada mediador solúvel avaliado. A análise dos dados demonstrou que a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD induz um aumento principalmente de IFN- γ , IL-3, TNF- α , CXCL8, CCL4, IL-6, CCL2, IL-1Ra, IL-1 β e CCL7. Por outro lado, foi observado uma redução de sFAS, CXCL5, TSLP, Trail e IL-18 (Figura 20).

Figura 20 – Perfil de mediadores solúveis de soro em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD



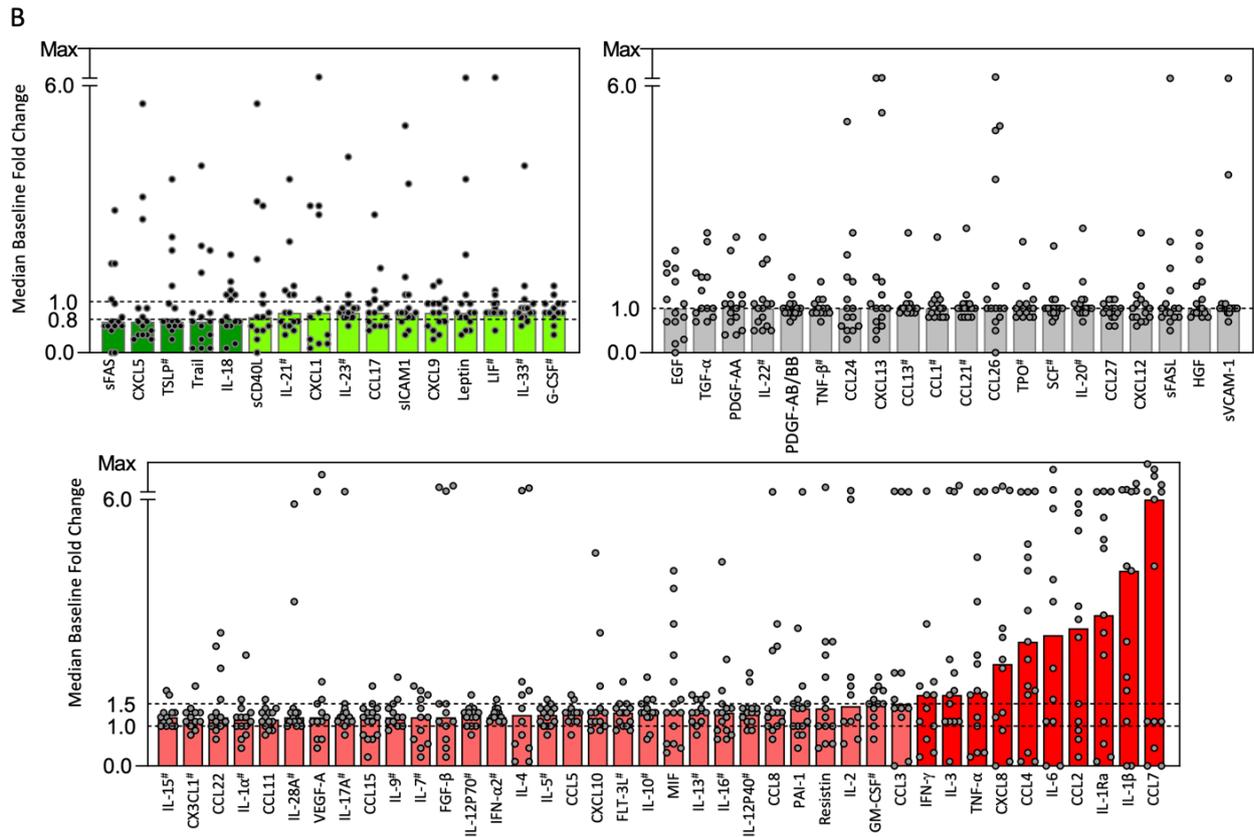


Figura 20 – Perfil de mediadores solúveis de soro em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD. (A) *Heatmap* construído a partir da mediana das alterações do baseline de cada mediador solúvel analisado. Verde escuro representa valores $\geq 0,5$ e $\leq 0,80$, verde claro $>0,80$ e <1 , cinza =1, vermelho claro >1 e $\leq 1,50$, vermelho escuro $>1,50$ e branco sem valores. Dessa forma, verde representa valores mínimos (0,5) e vermelho valores máximos (3,1). (B) Gráficos de dispersão com barra baseado na mediana das alterações do baseline de cada mediador solúvel analisado, onde vermelho representa os mediadores solúveis que tendem a aumentar, cinza os que não se alteram e verde os que tendem a diminuir. Foram considerados como ponto de corte 1,5, 1,0 e 0,8, respectivamente. FONTE: elaborado pelo autor.

Adicionalmente, foi realizada a análise de correlação a partir da construção de redes integrativas e matrizes de correlação. De forma geral, a análise dos dados demonstrou que a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD induz um aumento de correlações fortes entre os mediadores solúveis (quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e outros) (Figura 21).

Figura 21 – Mapeamento de redes de mediadores solúveis em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD

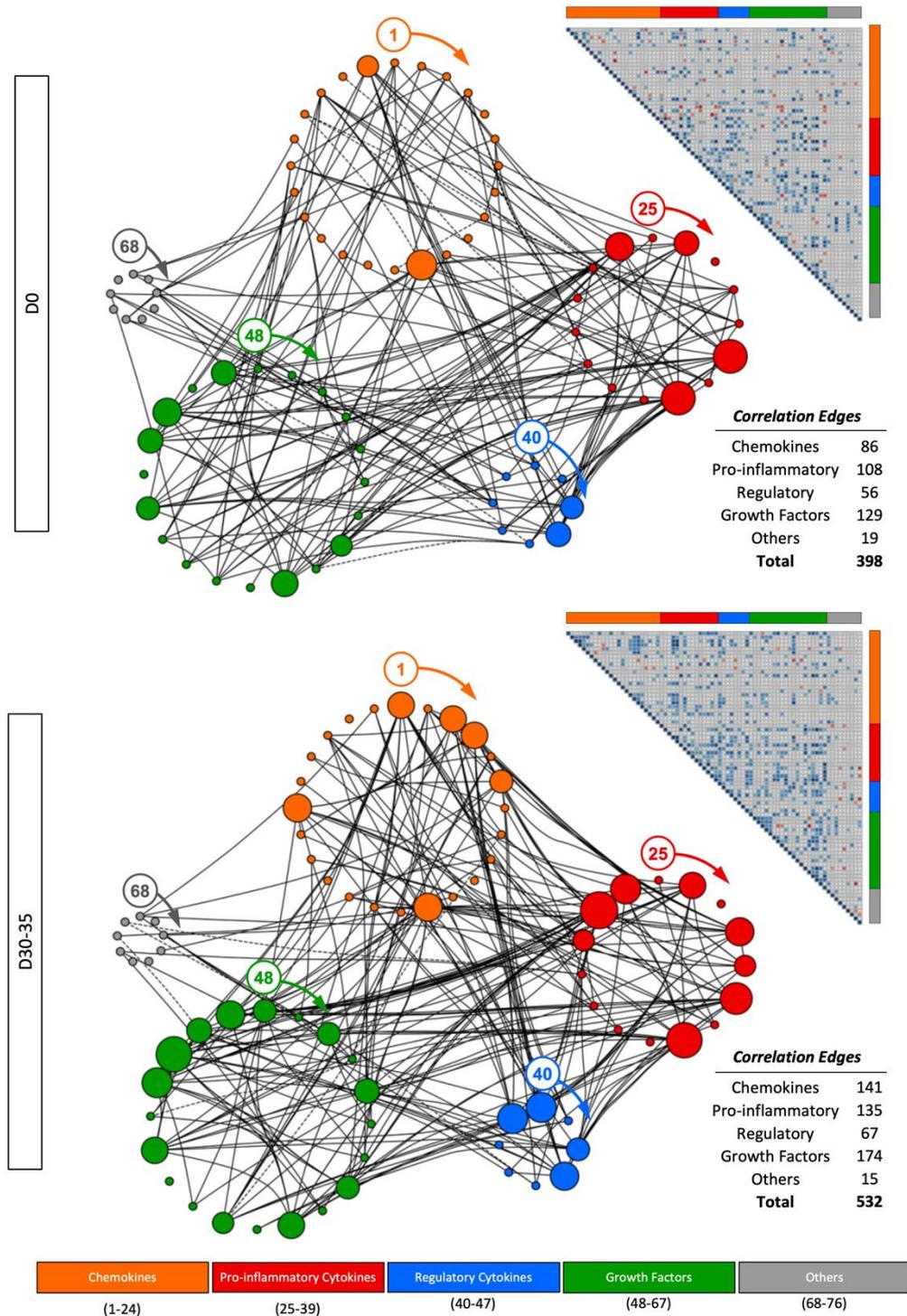


Figura 21 – Mapeamento de redes de mediadores solúveis em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD. A análise dos dados de correlação foi construída a partir de redes integrativas e matrizes de correlação. Para cada grupo, foram construídos *clusters* de mediadores. Quando o nó obteve menos de 10 conexões fortes, eles foram representados pelo mesmo tamanho. Quando o nó obteve mais de 10 conexões fortes, o tamanho foi proporcional ao número de

correlações fortes entre elas. As correlações negativas estão representadas por linhas tracejadas.
FONTE: elaborado pelo autor.

5.3.3 Análise de mediadores solúveis em amostras de sobrenadante de cultura

Mediadores solúveis em amostras de sobrenadante de cultura foram avaliados em Adultos (18-57^{Anos}) após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD em diferentes tempos de cultura: tempo 0 (T0), tempo 2 (T2), tempo 4 (T4) e tempo 6 (T6). Os resultados estão apresentados na Figura 22.

A análise dos dados demonstrou um perfil misto e polifuncional de produção dos mediadores solúveis durante os 6 dias de cultura *in vitro* antígeno-específica para FA. De forma geral, foi observado um aumento de PDGF-AA, CCL3, IL-2, CXCL8, IFN- γ , PDGF-AB/BB, CCL11 e IL-1Ra no T0; IL-13, CXCL8, IL-12P70, CXCL1, CX3CL1, IL-12P40, CCL7, TGF- α , CCL2, IL-1Ra, TNF- β e IL-7 no T2; IL-18, FTL-3L, IL-9, CCL3, VEGF-A, CCL5, CX3CL1, TGF- α e IL-12P70 no T4 e, por último, IL-17A, IFN- α 2, IFN- γ , IL-3, IL-2, IL-12P40, CCL5, IL-4, CCL22, TNF- α e IL-18 no T6.

Também foi observada uma redução de IL-12P40, VEGF-A, IL-3, IL-12P70, TNF- β , IL-15, IL-4, IL-13, IFN- α 2 e IL-7 no T0; PDGF-AB/BB, FGF- β , IL-17A, IL-3, sCD40L, CCL4 e IL-6 no T2; IFN- γ , IL-4, IFN- α 2, PDGF-AB/BB e IL-6 no T4 e, por último, IL-10, PDGF-AB/BB, CCL2, CCL3, VEGF-A, IL-5, IL-1 β , CCL7, CXCL1 e CX3CL1 no T6.

Figura 22 – Cinética e assinatura de mediadores solúveis de sobrenadante de cultura antígeno-específica para FA

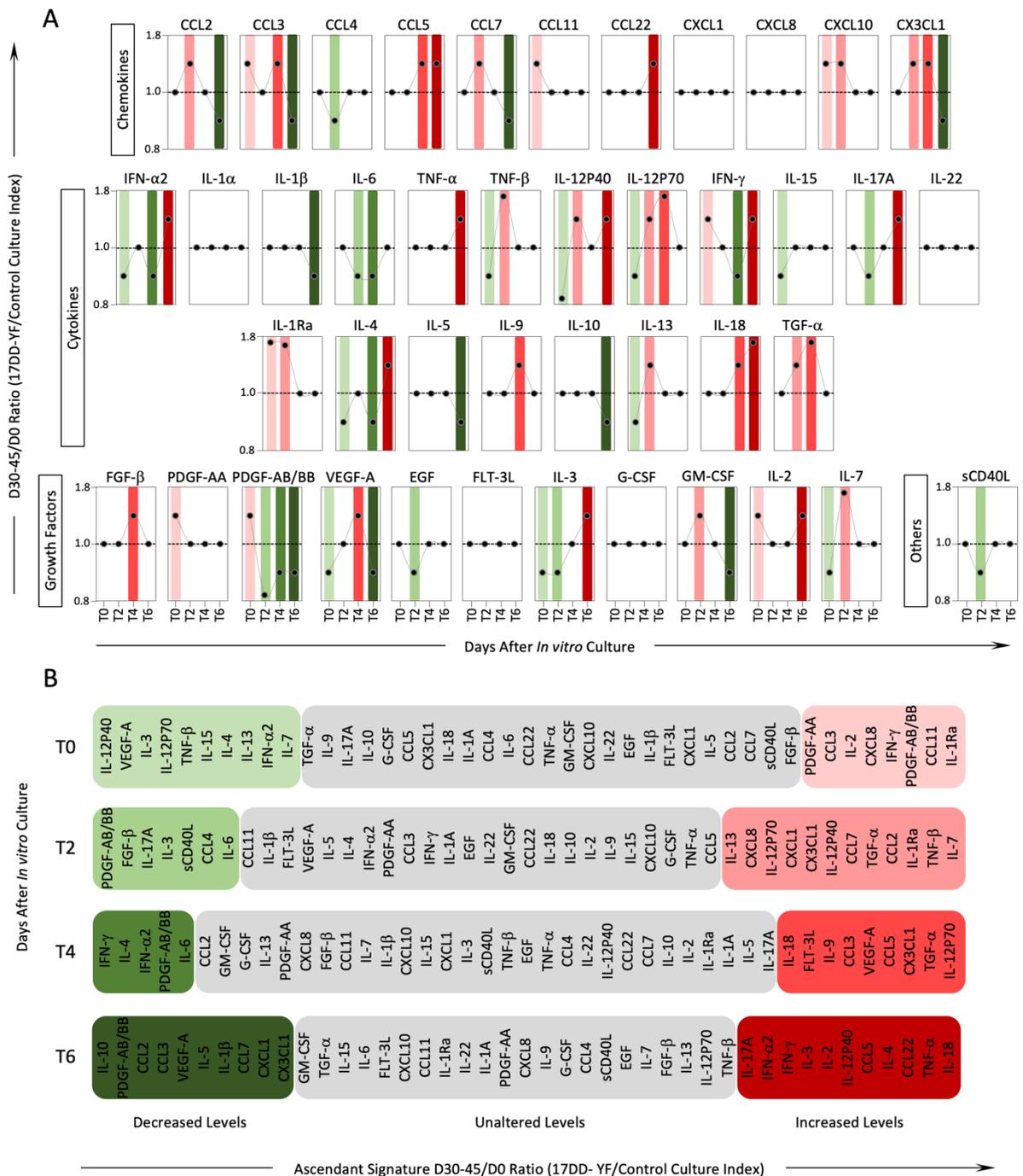


Figura 22 – Cinética e assinatura de mediadores solúveis de sobrenadante de cultura antígeno-específica para FA. (A) Cinética de mediadores solúveis de sobrenadante de cultura antígeno-específica para FA em Adultos (18-57^{Anos}) após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarilica 17DD. A análise foi realizada a partir do cálculo do índice das culturas (CE/CC) no tempo 0 (T0), tempo 2 (T2), tempo 4 (T4) e tempo 6 (T6) após cultura seguido pela determinação da razão D30-45/D0 dos valores de índice (CE/CC). (B) Assinatura de mediadores solúveis de sobrenadante de

cultura antígeno-específica para FA. A assinatura foi calculada a partir da razão D30-45/D0 dos valores de índice (CE/CC). FONTE: elaborado pelo autor.

5.4 Perfil de biomarcadores fenotípicos e funcionais em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD

O perfil de biomarcadores fenotípicos e funcionais foi avaliado em Adultos (18-57^{Anos}) antes da vacinação (D0) e no dia 30-45 (D30-45) após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD. Os resultados estão apresentados nas Figuras 23-26.

A análise das características fenotípicas da resposta celular antígeno-específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD demonstrou que a primovacinação induz um aumento do marcador CD57 em células TCD4⁺ e TCD8⁺ e uma redução dos marcadores CD27 e CD38 em células B (plasmoblastos) (Figura 23).

Figura 23 – Características fenotípicas da resposta celular antígeno-específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD

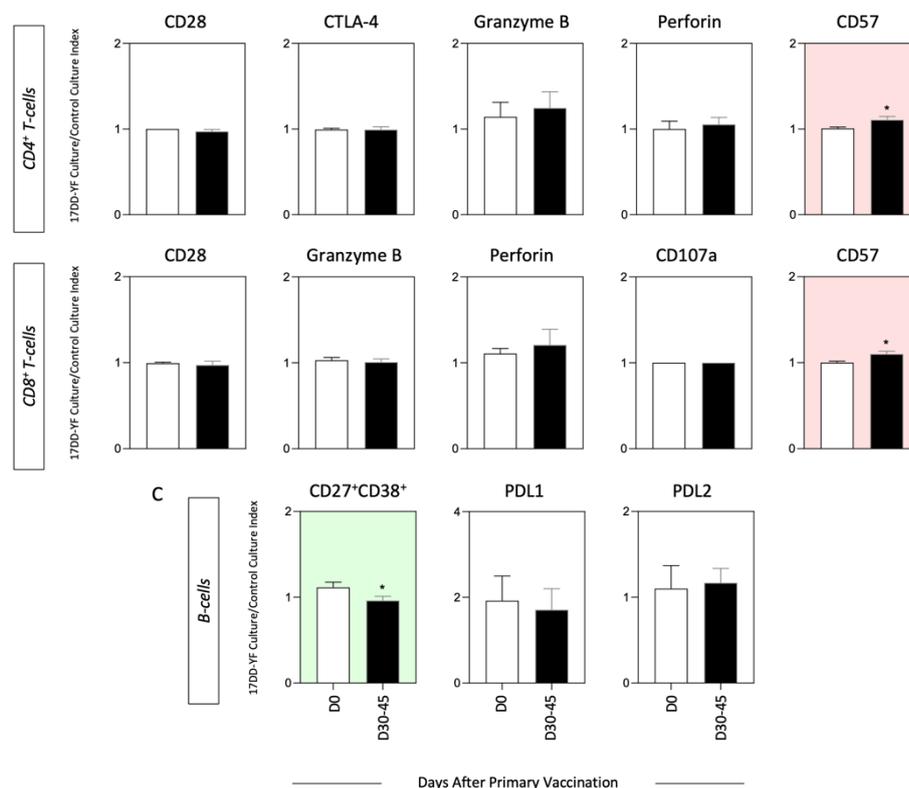


Figura 23 – Características fenotípicas da resposta celular antígeno-específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD. O perfil de biomarcadores fenotípicos foi avaliado por citometria de massa, conforme descrito na metodologia. Os resultados foram expressos em índice das culturas. A análise comparativa foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Em todos os casos, as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$ e destacadas por “*”. FONTE: elaborado pelo autor.

Em relação a análise da resposta de memória específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD, foi observado que a primovacinação induz um aumento de células TCD4⁺ e TCD8⁺ Efetoras Terminais (CD45RA⁺CCR7⁻), bem como células B de Memória Não Clássica (IgD⁺CD27⁺). Além disso também observou-se uma redução de células B de Memória Clássica (IgD⁻CD27⁺) (Figura 24).

Figura 24 – Resposta de memória específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD

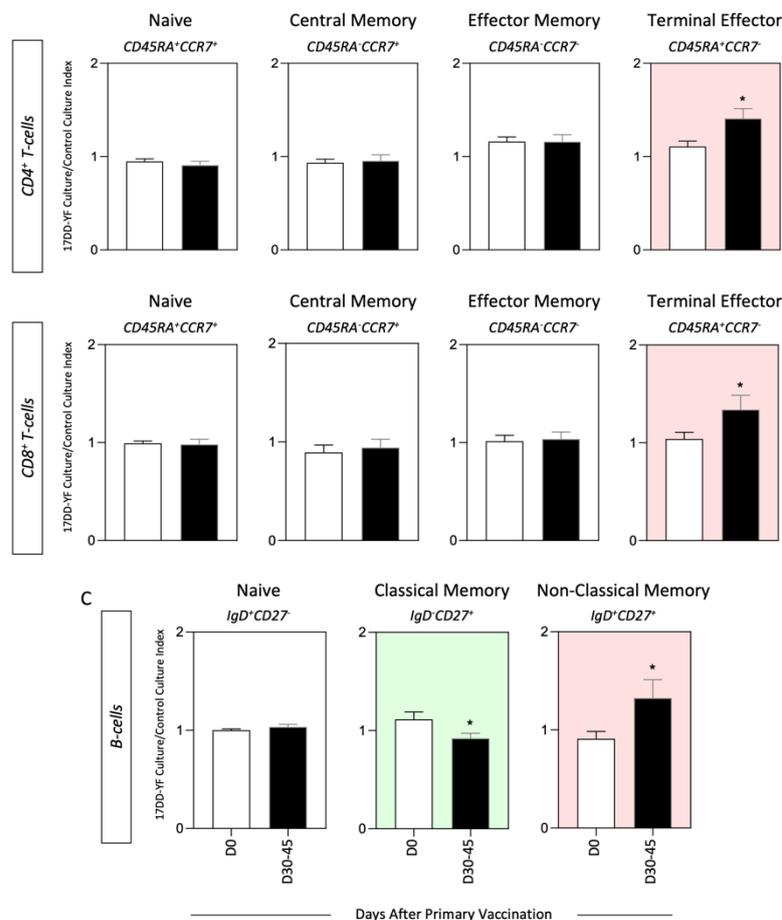


Figura 24 – Resposta de memória específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD. O perfil de biomarcadores fenotípicos foi avaliado por citometria de massa, conforme descrito na metodologia. Os resultados foram expressos em índice das

culturas. A análise comparativa foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Em todos os casos, as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$ e destacadas por “**”. FONTE: elaborado pelo autor.

Com o intuito de verificar o perfil de expressão individual dos marcadores de memória nas células TCD4⁺ e TCD8⁺ (CD45RA/CCR7) e nas células B (IgD/CD27), foi realizada uma análise por tSNE da resposta de memória específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.

A análise confirmou a presença do fenótipo CD45RA⁺CCR7⁻ em células TCD4⁺ e TCD8⁺ e IgD⁺CD27⁺ em células B no D30-45 após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD (Figura 25), corroborando com o achado anterior onde foi observado que a primovacinação induz um aumento de células TCD4⁺ e TCD8⁺ Efetoras Terminais (CD45RA⁺CCR7⁻), bem como células B de Memória Não Clássica (IgD⁺CD27⁺).

Figura 25 – Análise por tSNE da resposta de memória específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD

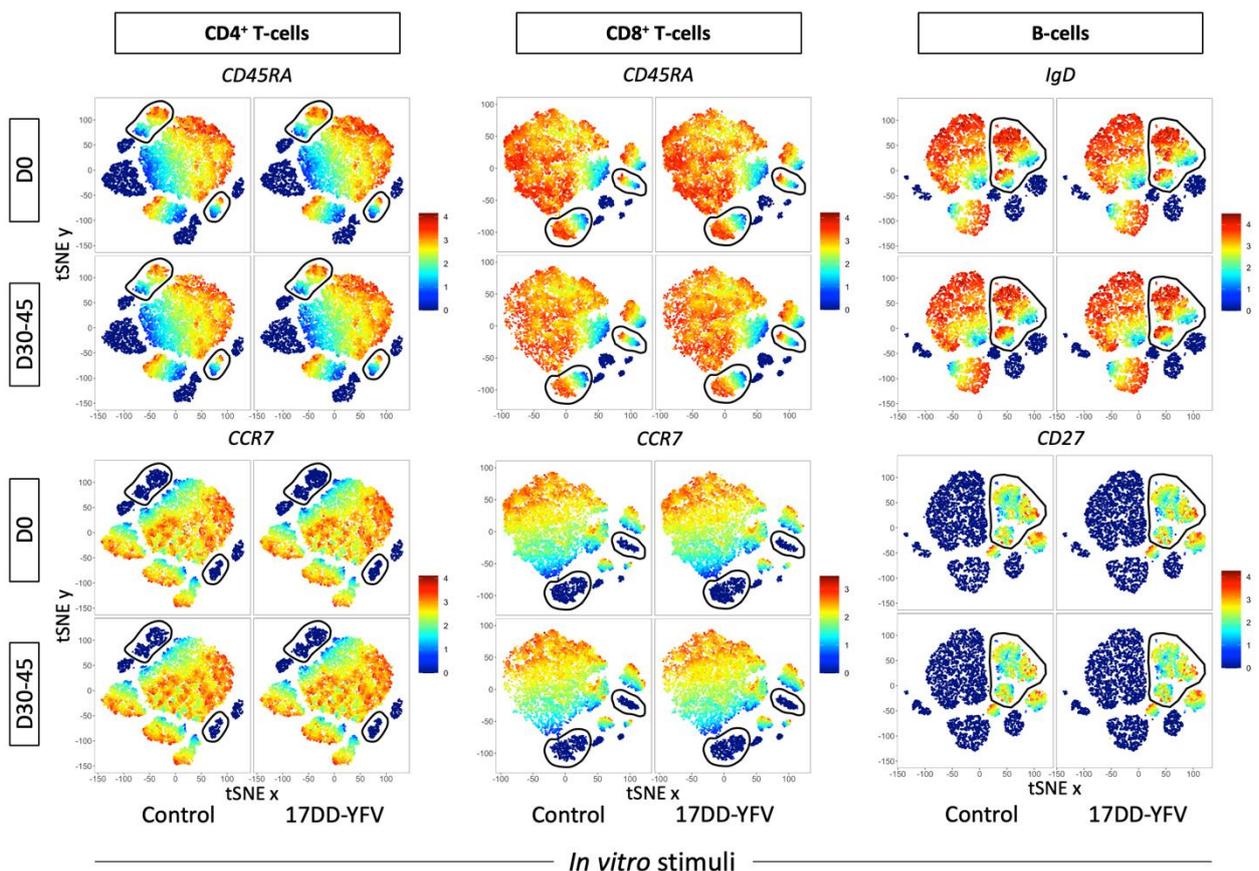


Figura 25 – Análise por tSNE da resposta de memória específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD. As populações foram definidas

por estratégia de seleção supervisionada. As populações de células T foram avaliadas considerando-se a expressão de CD3, CD4 ou CD8, CD45RA, CD27 e CCR7 e as populações de linfócitos B avaliadas considerando-se a expressão de CD19, CD20, CD21, IgD e CD27. A intensidade de expressão de CD45RA e CCR7 em células T CD4+ (gráficos a direita) e células T CD8+ (gráficos no centro) e de IgD e CD27 em linfócitos B (gráficos a direita) estão representados em escalas de cor, de azul (sem expressão) a vermelho (alta expressão) e cada evento (célula) está representado por um ponto colorido. As formas geométricas evidenciam populações com densidades qualitativamente diferentes entre antes (D0) e 30-45 dias (30-45) após imunização e entre as condições de cultura, sendo elas ausência de estímulo (Control) e estimuladas com antígeno vacinal (17DD-YFV). Cada quadrante possui o mesmo número total de eventos e representa um dos grupos avaliados. FONTE: elaborado pelo autor.

Também foi avaliado o perfil funcional da resposta celular específica para FA, o qual foi demonstrado que a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD induz um aumento de TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17 e IL-2 em células TCD4⁺; TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-10, IL-17 e IL-2 em células TCD8⁺ e de TNF- α , IL-5 e IL-10 em células B. Além disso, também foi observado um redução de IL-5 em células TCD4⁺ (Figura 26).

Figura 26 – Perfil funcional da resposta celular específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD

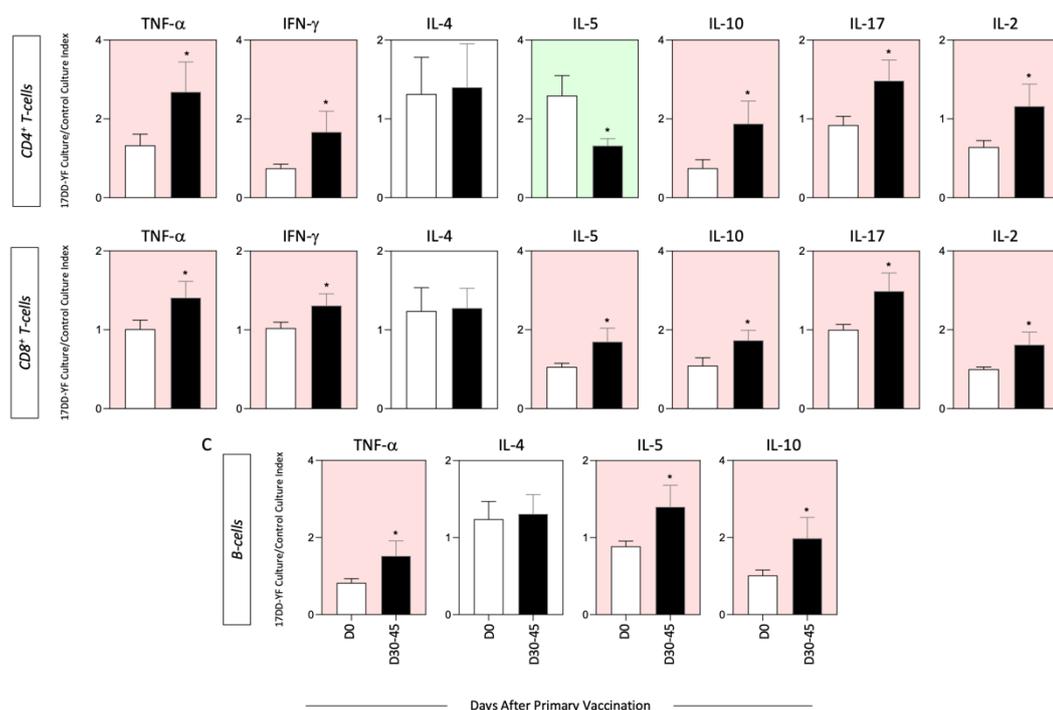


Figura 26 – Perfil funcional da resposta celular específica para FA em adultos após a primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD. O perfil de biomarcadores funcionais foi avaliado por citometria de massa, conforme descrito na metodologia. Os resultados foram expressos em índice das culturas. A análise comparativa foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn. Em todos os casos, as diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$ e destacadas por “*”. FONTE: elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A FA continua sendo uma ameaça à saúde global, com crescentes surtos graves reportados nos últimos anos em áreas tropicais. Esses eventos de reemergência da doença têm sido relatados em áreas com circulação historicamente baixa ou nenhuma circulação do vírus de FA, sugerindo que a cobertura vacinal não deve se limitar apenas às áreas com circulação do vírus de FA (SHEARER et al., 2017). Nesse sentido, o Ministério da Saúde do Brasil ampliou recentemente a recomendação da vacinação de FA para todo o território nacional, uma vez que, em casos de surtos, residentes de áreas com baixa ou sem circulação do vírus de FA constituem uma população vulnerável à infecção devido à baixa cobertura vacinal (BVS, 2021).

Além disso, em decorrência do agravamento do cenário epidemiológico da FA e do aumento na demanda de vacinas, a OMS, juntamente com o Ministério da Saúde do Brasil, adotou o uso da dose fracionada da vacina antiamarílica como estratégia de imunização em decorrência da situação emergencial do país e do mundo (OPAS; OMS, 2018).

Com o objetivo de fornecer evidências científicas que possam contribuir para o melhor entendimento da resposta imune induzida pela vacina antiamarílica 17DD, o presente estudo foi capaz de fornecer um claro panorama da imunidade humoral e celular induzida pela dose padrão e dose fracionada da vacina antiamarílica. O estudo avaliou o impacto do status sorológico prévio para Flavivírus e a influência da idade na resposta celular específica para FA em indivíduos residentes em áreas sem circulação do vírus amarílico após a vacinação com a dose padrão da vacina 17DD. Além disso, também foi caracterizado o perfil de anticorpos neutralizantes e mediadores solúveis em adultos submetidos à primovacinação com a dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD.

Com base no primeiro objetivo, os resultados demonstraram que as taxas de soropositividade em indivíduos residentes em áreas sem circulação do vírus amarílico foram maiores para DENGUE, ZIKA e FA, respectivamente. Para avaliar o impacto do status sorológico prévio para Flavivírus (FA, DENGUE e ZIKA) na resposta celular específica para FA, vários biomarcadores relacionados à memória celular foram avaliados a partir da cultura *in vitro* antígeno-específica de longa duração de PBMC obtidas a partir de coágulo sanguíneo. Nossos resultados demonstraram que apenas a soropositividade pré-existente para FA está associada a níveis mais elevados de

biomarcadores específicos para FA (NCD4, EMCD8, IFN-MCD8, NCD19 e nCMCD19) em comparação com indivíduos soronegativos na linha de base do estudo. Nenhuma diferença foi observada na imunidade celular específica para FA ao considerar o status sorológico para DENGUE ou ZIKA.

Até onde sabemos, existem poucos relatos na literatura científica que descrevem o impacto do status sorológico prévio para Flavivírus na resposta celular específica à vacina de FA. A maioria dos estudos se concentra na avaliação da reatividade cruzada entre anticorpos neutralizantes para FA e outros Flavivírus (MONTROYA et al., 2018; REY et al., 2018; SOUZA et al., 2019; STETTLER et al., 2016). Campi-Azevedo et al. (2019) demonstraram que a resposta humoral pré-existente para DENGUE não afeta a imunidade celular ao longo do tempo após a vacinação secundária com a vacina antiamarílica 17DD (CAMPI-AZEVEDO et al., 2019a).

A presença de resposta celular específica para FA observada na linha de base do estudo entre os indivíduos soropositivos para FA pode representar um estado de memória de ativação imune induzida pela vacinação prévia de FA e não pela pré-exposição ao vírus selvagem, uma vez que o estudo foi realizado em uma área sem circulação do vírus de FA. A possibilidade de reatividade cruzada também foi considerada. No entanto, Grifoni et al. (2020) testaram a reatividade cruzada de respostas de células T para Flavivírus em indivíduos previamente expostos à DENGUE e posteriormente imunizados com a vacina antiamarílica 17D-204 e foi demonstrado uma reatividade cruzada limitada para as respostas de células T CD4⁺ e T CD8⁺ entre os Flavivírus (GRIFONI et al., 2020).

Para concluir o segundo objetivo, os títulos de anticorpos neutralizantes e as taxas de soropositividade para FA foram avaliadas, a fim de compreender a influência da idade na primovacinação antiamarílica 17DD. Nossos resultados demonstraram que as taxas de soropositividade atingem níveis semelhantes em crianças (9^{Meses}-2^{Anos}), crianças (3-4^{Anos}) e adultos (18-49^{Anos}) no D30-45, com uma redução substancial observada no D365 em crianças mais jovens (9^{Meses}-2^{Anos}) (94% vs 87% , 95% vs 96% e 100% vs 99%, respectivamente). No entanto, os níveis de anticorpos neutralizantes foram significativamente mais baixos em crianças comparados a adultos. Noronha et al. (2019) realizaram uma investigação a fim de avaliar a duração da imunidade humoral pós-vacinação com a vacina antiamarílica em crianças e os resultados demonstraram uma redução substancial na proporção de soropositividade, bem como uma menor taxa de soropositividade em bebês recém-vacinados (86,7% após 6

meses e 76,4% após 18 meses) (DE NORONHA et al., 2019). Campi-Azevedo et al. (2019) também demonstraram uma diminuição dependente do tempo nos títulos de anticorpos neutralizantes em crianças vacinadas com a vacina antiamarílica, atingindo 79% de soropositividade 1 ano após a vacinação (CAMPI-AZEVEDO et al., 2019a). Nossos resultados corroboram com esses achados, indicando um declínio substancial dos anticorpos neutralizantes pós-vacinação em crianças e apoiando a existência de uma imunidade de curto prazo da vacina antiamarílica neste grupo etário. Outros estudos também demonstraram essa redução significativa nos títulos de anticorpos neutralizantes em crianças (COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES WITH YELLOW FEVER VACCINE, 2007; DOMINGO et al., 2019; GRUPO COLABORATIVO DO PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES PARA O ESTUDO DA SOROCONVERSÃO PELA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA, 2003; HEPBURN et al., 2006), indicando que as crianças podem ser mais vulneráveis à infecção pelo vírus da FA devido à expansão das áreas de circulação viral.

A análise da influência da idade nas células T e B de memória específicas para a FA após a primovacinação antiamarílica 17DD demonstrou que, independentemente do subgrupo de idade, a primovacinação induziu um aumento de células EMCD8 e nCMCD19 no D30-45 em comparação com D0. Vários estudos apoiam fortemente a relevância das células T CD8⁺ de memória como correlato de proteção após a vacinação contra a FA (CAMPI-AZEVEDO et al., 2016; COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACCINES, 2014; COSTA-PEREIRA et al., 2018; QUEREC et al., 2009; REINHARDT et al., 1998). Além disso, Costa-Pereira et al. (2018) e Campi-Azevedo et al. (2019) demonstraram que a primovacinação antiamarílica 17DD promove um aumento de células T e B de memória (CAMPI-AZEVEDO et al., 2019a; COSTA-PEREIRA et al., 2018).

Nossos resultados demonstraram que vários biomarcadores relacionados à memória celular específica para FA identificados no D30-45 permanecem estáveis no D365 em todos os subgrupos de idade. No entanto, observou-se uma clara redução da magnitude da resposta imune celular em crianças, especialmente no grupo de crianças mais jovens (9^{Meses}-2^{Anos}), o qual observa-se um declínio de células EMCD8 no D365. Estudos que avaliaram a duração da imunidade específica para FA induzida pela primovacinação em crianças ainda são escassos. Porém, estudos anteriores do nosso grupo demonstraram uma persistência de curta duração de células T e B de memória (EMCD4, EMCD8, nCMCD19) em crianças, atingindo valores críticos 4 anos

após a primovacinação (CAMPI-AZEVEDO et al., 2019b). O declínio precoce do EMCD8 aqui observado em crianças mais jovens ($9^{\text{Meses}}-2^{\text{Anos}}$), reforça a relevância de doses de reforço da vacina de FA para garantir a persistência de correlatos de proteção em crianças.

Juntos, esses resultados demonstraram que, independentemente das semelhanças observadas nos anticorpos neutralizantes, a idade na primovacinação impacta na duração da resposta celular induzida pela primovacinação antiamarílica 17DD. Estudos demonstraram previamente que os anticorpos neutralizantes específicos para FA e as respostas de células T e B apresentam um declínio dependente do tempo após a primovacinação, especialmente em crianças (CAMPI-AZEVEDO et al., 2016, 2019b; COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACCINES, 2014; COSTA-PEREIRA et al., 2018). O Grupo Colaborativo para o Estudo de Vacinas contra Febre Amarela já demonstrou que a idade na primovacinação é uma variável importante que pode impactar a taxa de soroconversão (GRUPO COLABORATIVO DO PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES PARA O ESTUDO DA SOROCONVERSÃO PELA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA, 2003). O rápido declínio da imunidade durante os primeiros anos após a vacinação foi relatado após a vacinação de bebês com idade de 9 meses, o que sugere uma revisão da recomendação de dose única para este público-alvo em países endêmicos (DOMINGO et al., 2019). A curta duração da imunidade humoral e celular observada em indivíduos vacinados corrobora com estudos anteriores e com a recomendação atual do Ministério da Saúde de uma dose de reforço aos 5 anos de idade. A inclusão da vacina de FA no programa de imunização de crianças e adultos residentes de áreas sem circulação de FA representa uma medida importante para antecipar a proteção, porém a recomendação da dose de reforço regular deve ser considerada para garantir o controle efetivo da expansão da FA.

Em relação ao terceiro e quarto objetivos, os resultados demonstraram que a primovacinação em adultos submetidos à dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD induz um aumento significativo dos níveis de anticorpos específicos para a FA. Além disso, também foi observada uma complexa resposta imune celular, o qual vários mediadores solúveis e biomarcadores fenotípicos e funcionais foram identificados após a primovacinação.

Estudos anteriores que avaliaram a resposta imune induzida pela dose padrão da vacina antiamarílica 17DD mostraram a importância dos títulos de anticorpos

preservados e da resposta de EMCD8 como correlatos de proteção específicos para a FA (COSTA-PEREIRA et al., 2018). Entretanto, estudos que avaliaram a resposta imune induzida pela primovacinação em indivíduos que receberam a dose fracionada da vacina antiamarílica, especialmente durante a campanha de vacinação em massa no Brasil, ainda são escassos.

Estudos realizados por nosso grupo que avaliaram a resposta imune induzida pela vacina antiamarílica em doses menores, mostraram taxas de soroconversão similares a dose padrão em doses até 50x menores (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014; MARTINS et al., 2013). Nesse sentido, o presente estudo corrobora com estes achados, uma vez que foi identificada uma resposta similar de anticorpos neutralizantes após a primovacinação com a dose fracionada (1/5 da dose padrão). Além disso, também foi observada uma resposta significativa de EMCD8, o qual foi identificado anteriormente como um importante correlato de proteção específico para a FA (COSTA-PEREIRA et al., 2018).

Em relação aos mediadores solúveis, estudos realizados por nosso grupo demonstraram uma indução de citocinas pro-inflamatórias, como $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ e moduladoras, como IL-5 e IL-10, pós-vacinação com a dose padrão da vacina 17DD (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014), corroborando novamente com os resultados aqui apresentados, os quais foram identificados os mesmos biomarcadores após a primovacinação com a dose fracionada da vacina 17DD de FA.

Juntos, os achados demonstraram que a resposta imune induzida pela dose fracionada (1/5 da dose padrão) é comparável aquela observada para a dose padrão da vacina 17DD de FA. Os níveis de anticorpos neutralizantes em conjunto com a resposta de EMCD8 e de mediadores solúveis fornecem evidências relevantes para a viabilidade do uso da dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD em situações emergenciais.

Entretanto, torna-se necessário estudos adicionais que avaliem a duração da imunidade pós vacinação com a dose fracionada da vacina 17DD, bem o uso de doses menores em outras populações, como imunocomprometidos, crianças menores de 2 anos de idade, idosos, mulheres grávidas, dentre outros, a fim de fornecer um panorama abrangente da imunidade induzida pela dose fracionada da vacina antiamarílica e subsidiar futuras estratégias de vacinação.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo contribuiu para a atualização do conhecimento científico acerca da imunidade vacinal antiamarílica 17DD induzida pela dose padrão e dose fracionada. Os resultados aqui apresentados esclarecem aspectos científicos a respeito do impacto do status sorológico prévio para Flavivírus e a influência da idade na eficácia e imunogenicidade da dose padrão da vacina 17DD em indivíduos residentes de áreas sem circulação do vírus da FA. Além disso, o estudo também foi capaz de oferecer aspectos importantes sobre a resposta imune induzida pela dose fracionada em indivíduos primovacinados durante a campanha de vacinação em massa no Brasil com a dose fracionada da vacina antiamarílica. Em suma, os resultados oferecem novos conhecimentos que serão úteis para fornecer um panorama abrangente da imunidade induzida pela dose padrão e dose fracionada da vacina antiamarílica, bem como sobre os correlatos de proteção em áreas sem a circulação do vírus de FA.

REFERÊNCIAS

AHMED, R.; AKONDY, R. S. Insights into human CD8+ T-cell memory using the yellow fever and smallpox vaccines. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 3, p. 340–345, 2011.

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

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

BANNARD, O.; KRAMAN, M.; FEARON, D. Pathways of memory CD8+ T-cell development. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 2083–2087, 2009.

BARRETT, A. D. T.; HIGGS, S. Yellow fever: A disease that has yet to be conquered. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 209–229, 2007.

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

BIFANI, A. M.; ONG, E. Z.; DE ALWIS, R. Vaccination and Therapeutics: Responding to the Changing Epidemiology of Yellow Fever. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 398–409, 2020.

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

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA Nº 597, DE 08 DE ABRIL DE 2004.**

Disponível em:

<https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2004/prt0597_08_04_2004.html>.

Acesso em: 3 out. 2021.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico - Aspectos epidemiológicos da febre amarela silvestre e a vigilância intensificada durante período de monitoramento, Brasil, 2012/2013.**

Brasília: Ministério da Saúde, v. 45n. 07, p.1-10, 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Febre amarela: guia para profissionais de saúde.** Brasília : Ministério da Saúde, p. 67, 2017.

BIOMANGUINHOS, INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. **Bio-Manguinhos assina acordo para produzir nova vacina contra febre amarela,**

2011. Disponível em:<<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/355-bio-manguinhos-assina-acordo-para-produzir-nova-vacina-contrafebre-amarela>>.

Acesso em: 12 nov. 2021.

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

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. **Fields virology.** Philadelphia, 852-921, 2001.

BVS, BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. **Em 2020, Ministério da Saúde amplia público para vacinas contra febre amarela e gripe.** Disponível em:

<<https://bvsmms.saude.gov.br/em-2020-ministerio-da-saude-amplia-publico-para-vacinas-contrafebre-amarela-e-gripe/>>. Acesso em: 3 set. 2021.

CAMACHO, L. A. B. et al. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: A randomized trial. **Revista de Saude Publica**, v. 38, n. 5, p. 671–678, 2004.

CAMACHO, L. A. B. et al. A randomised double-blind clinical trial of two yellow fever vaccines prepared with substrains 17DD and 17D-213/77 in children nine-23 months old. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 771–780, 2015.

CAMPI-AZEVEDO, A. C. et al. 17DD and 17D-213/77 Yellow Fever Substrains Trigger a Balanced Cytokine Profile in Primary Vaccinated Children. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

CAMPI-AZEVEDO, A. C. et al. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.

CAMPI-AZEVEDO, A. C. et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 12, n. 2, p. 491–502, 2016.

CAMPI-AZEVEDO, A. C. et al. 17Dd Yellow Fever Revaccination and Heightened Long-Term Immunity in Populations of Disease-Endemic Areas, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 8, p. 1511–1521, 2019a.

CAMPI-AZEVEDO, A. C. et al. Short-lived immunity after 17DD yellow fever single dose indicates that booster vaccination may be required to guarantee protective immunity in children. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. SEP, p. 1–13, 2019b.

CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Risk of re-emergence of urban yellow fever in Brazil. v. 26, n. 3, p. 6–8, 2017.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Grading of recommendations, assessment, development, and evaluation (GRADE) for yellow fever vaccine booster doses**. v. 64, n. 23, p. 647–650, 2015.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION; NCEZID, National CENTER FOR EMERGING AND ZOO NOTIC INFECTIOUS DISEASES; DVBD, DIVISION OF VECTOR-BORNE DISEASES. **Transmission of Yellow Fever Virus, 2019**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/index.html>>. Acesso: 23 set. 2021.

COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACCINES.

Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. **Vaccine**, v. 32, n. 39, p. 4977–4984, 2014.

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**, v. 25, n. 16 SPEC. ISS., p. 3118–3123, 2007.

COSTA-PEREIRA, C. et al. Multi-parameter approach to evaluate the timing of memory status after 17DD-YF primary vaccination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. 1–17, 2018.

COUTO-LIMA, D. et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. n. March, p. 1–12, 2017.

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

DE NORONHA, T. G. et al. Duration of post-vaccination humoral immunity against yellow fever in children. **Vaccine**, v. 37, n. 48, p. 7147–7154, 2019.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. Advances in immunology: Second of two parts. **The New England journal of medicine**, v. 343, n. 2, p. 108–117, 2000.

DENANI, C. B. D. et al. Improvement in Throughput and Accuracy of Neutralization Assay Results by the Automation of Image Acquisition and Analysis. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 25, n. 5, p. 19515–19520, 2020.

DOMINGO, C. et al. Long-term immunity against yellow fever in children vaccinated during infancy: a longitudinal cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 12, p. 1363–1370, 2019.

DORIGATTI, I. et al. International risk of yellow fever spread from the ongoing outbreak in Brazil. **bioRxiv**, n. 43, p. 1–4, 2017.

DOUAM, F.; PLOSS, A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 913–928, 2018.

DUARTE-NETO, A. N. et al. Yellow fever and orthotopic liver transplantation: new insights from the autopsy room for an old but re-emerging disease. **Histopathology**, v. 75, n. 5, p. 638–648, 2019.

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

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

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D.; GENETICS, M. Yellow fever: a reemerging threat. **Clin Lab Med**, v. 30, n. 1, p. 237–260, 2010.

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

GIBNEY, K. B. et al. Detection of anti-yellow fever virus immunoglobulin M antibodies at 3-4 years following yellow fever vaccination. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 6, p. 1112–1115, 2012.

GOTUZZO, E.; YACTAYO, S.; CÓRDOVA, E. Review article: Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: Systematic review on the need for a booster every 10 years. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 434–444, 2013.

GRIFONI, A. et al. T Cell Responses Induced by Attenuated Flavivirus Vaccination Are Specific and Show Limited Cross-Reactivity with Other Flavivirus Species. **Journal of Virology**, v. 94, n. 10, 2020.

GRUPO COLABORATIVO DO PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES PARA O ESTUDO DA SOROCONVERSÃO PELA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA. Estudo multicêntrico de soroconversão pela vacina contra febre amarela. **Ciênc saúde colet**, v. 8, p. (Suppl. 2):511, 2003.

HEPBURN, M. J. et al. Neutralizing antibody response to booster vaccination with the 17d yellow fever vaccine. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 2843–2849, 2006.

HOU, J. et al. A systems vaccinology approach reveals temporal transcriptomic changes of immune responses to the yellow fever 17D vaccine. **J Immunol.**, v. 199, n. 4, p. 1476–1489, 2017.

JEAN, K. et al. A meta-analysis of serological response associated with yellow fever vaccination. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6, p. 1435–1439, 2016.

JOHANSSON, M. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; STAPLES, J. E. The whole iceberg: Estimating the incidence of yellow fever virus infection from the number of severe cases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 8, p. 482–487, 2014.

JONKER, E. F. F.; VISSER, L. G.; ROUKENS, A. H. Advances and controversies in yellow fever vaccination. p. 144–152, 2013.

KALLAS, E. G. et al. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 7, p. 750–758, 2019.

KOHLER, S. et al. The early cellular signatures of protective immunity induced by live

viral vaccination. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 9, p. 2363–2373, 2012.

LIN, D.; GUPTA, S.; MAECKER, H. . Intracellular Cytokine Staining on PBMCs Using CyTOF™ Mass Cytometry. **Bio-protocol**, v. 5, n. 1, 2015.

MARTINS, M. Â. et al. Activation/modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: Is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 148, n. 1, p. 90–100, 2007.

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

MARTINS, R. DE M. et al. Duration of post-vaccination immunity to yellow fever in volunteers eight years after a dose-response study. **Vaccine**, v. 36, n. 28, p. 4112–4117, 2018.

MARTINS, R. M. et al. 17DD yellow fever vaccine: A double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 9, n. 4, p. 879–888, 2013.

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

MONATH, T. P. et al. Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (ARILVAX and YF-VAX) in a phase III multicenter, double-blind clinical trial. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 66, n. 5, p. 533–541, maio 2002.

MONATH, T. P. priorities for vaccination . p. 341–347, 2006.

MONATH, T. P. et al. **Yellow fever vaccine**. Elsevier Inc., Sixth Edit ed., 2012.

MONATH, T. P. Neutralizing antibody responses in the major immunoglobulin classes to yellow fever 17D vaccination of humans. **Am. J. Epidemiol**, v. 93, n. 2, p. 122-129, 1971.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, 2015.

MONTOYA, M. et al. Longitudinal analysis of antibody cross-neutralization following zika virus and dengue virus infection in Asia and the Americas. **Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 4, p. 536–545, 2018.

MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of Assembly: roles of Flaviviridae nonstructural proteins in virion morphogenesis. v. 6, n. 9, p. 699–708, 2009.

MUTEBI, J.; BARRETT, A. D. T. The epidemiology of yellow fever in Africa. v. 4, p. 1459–1468, 2002.

MUYANJA, E. et al. Erratum: Immune activation alters cellular and humoral responses to yellow fever 17D vaccine (The Journal of Clinical Investigation (2014) 124:10 (4669)). **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 10, p. 4669, 2014.

NEVES, P. C. C. et al. CD8+ gamma-delta TCR+ and CD4+ T cells produce IFN- γ at 5-7 days after yellow fever vaccination in Indian rhesus macaques, before the induction of classical antigen-specific T cell responses. **Vaccine**, v. 28, n. 51, p. 8183–8188, 2010.

NEVES, P. C. C. et al. Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptive immune responses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–16, 2013.

OPAS, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Febre amarela**. Disponível

em: <<https://www.paho.org/pt/node/40>>. Acesso em: 23 set. 2021.

OPAS, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE; OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Brasil anuncia fracionamento de doses de vacina contra febre amarela em três estados, 2018**. Disponível em:

<<https://www.paho.org/pt/noticias/9-1-2018-brasil-anuncia-fracionamento-doses-vacina-contrafebre-amarela-em-tres-estados>>. Acesso em: 4 out. 2021.

PIERSON, T. C. et al. Structural Insights into the Mechanisms of Antibody-Mediated Neutralization of Flavivirus Infection: Implications for Vaccine Development. **Cell Host and Microbe**, v. 4, n. 3, p. 229–238, 2008.

PNI, PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES; DEVIT/SVS/MS, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Nota informativa nº 143/CGPNI/DEVIT/SVS/MS: Recomendações da vacinação contra Febre Amarela, após a declaração da Organização Mundial da Saúde, 2014**. Disponível em:

<https://saude.campinas.sp.gov.br/doencas/febre_amarela/2016/Nota-Informativa-143-Febre-Amarela-Site-A-a-Z-1.pdf>. Acesso em: 29 set. 2021.

POSSAS, C. et al. Yellow fever outbreak in Brazil : the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. v. 113, n. 10, p. 1–12, 2018.

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

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

QUEREC, T. D.; PULENDRAN, B. Understanding the role of innate immunity in the mechanism of action of the live attenuated yellow fever vaccine 17D. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 590, p. 43–53, 2007.

REINHARDT, B. et al. Development of viremia and humoral and cellular parameters

of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: A model of human flavivirus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 56, n. 2, p. 159–167, 1998.

REIS, L. R. et al. Exploratory study of humoral and cellular immunity to 17DD Yellow Fever vaccination in children and adults residents of areas without circulation of Yellow Fever Virus. **Vaccine**, 2021.

REY, F. A. et al. The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. **EMBO reports**, v. 19, n. 2, p. 206–224, 2018.

REZENDE, I. M. et al. Late-relapsing hepatitis after yellow fever. **Viruses**, v. 12, n. 2, 2020.

ROLLINS, B. D.; RAMSEY, R.; PARSH, B. Yellow fever. 2017.

ROUKENS, A. H. E. et al. Long-term protection after fractional-dose yellow fever vaccination follow-up study of a randomized, controlled, noninferiority trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 169, n. 11, p. 761–765, 2018.

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

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

SOUZA, N. C. S. E. et al. Evaluation of serological cross-reactivity between yellow fever and other flaviviruses. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 81, p. 4–5, 2019.

STAPLES, J. E.; GERSHMAN, M.; FISCHER, M. Yellow fever vaccine.

Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2002. **MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports / Centers for Disease Control**, v. 51, n. RR-17, 2002.

STETTLER, K. et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 823–826, 2016.

SVS, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Febre Amarela**. Disponível em: <[https://www.saude.mg.gov.br/febreamarela#:~:text=Deve-se respeitar um intervalo,tomar a da febre amarela.>](https://www.saude.mg.gov.br/febreamarela#:~:text=Deve-se%20respeitar%20um%20intervalo,tomar%20a%20da%20febre%20amarela.>). Acesso em: 3 out. 2021.

SVS, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEIDT, DEPARTAMENTO DE IMUNIZAÇÃO E DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **PLANO DE CONTINGÊNCIA PARA RESPOSTA ÀS EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA: FEBRE AMARELA, 2021**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/agosto/5/plano_contingencia_emergencias_febre_amarela_2_ed.pdf>. Acesso em: 24 set. 2021.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre amarela : reflexões sobre a doença , as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização Yellow fever : reflections on the. v. 5, p. 244–258, 2002.

VASCONCELOS, P. F. C. ET AL. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. **J Med Virol**, v. v. 65, n., p. 598–604, 2001b., 2001.

VASCONCELOS, P. F. C.; MONATH, T. P. Yellow Fever Remains a Potential Threat to Public Health. v. XX, n. Xx, p. 1–2, 2016.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS, E. S.; TRAVASSOS, J. F. S. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses Gestão imprópria do ecossistema natural na Amazônia brasileira resulta na emergência e reemergência de arbovírus. v. 17, p. 155–164, 2001.

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

VRATSKIKH, O. et al. Dissection of Antibody Specificities Induced by Yellow Fever Vaccination. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.

WAGGONER, J. J.; ROJAS, A.; PINSKY, B. A. Yellow fever virus: Diagnostics for a persistent arboviral threat. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 10, 2018.

WER, WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD. **Global yellow fever update, 2020**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/344323/WER9633-377-392-eng-fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 24 set. 2021.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Yellow fever vaccination booster not needed, 2013**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/17-05-2013-yellow-fever-vaccination-booster-not-needed>>. Acesso em: 26 set. 2021.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Yellow fever vaccine : WHO position on the use of fractional doses – June 2017. n. June, p. 345–350, 2017.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Yellow Fever Fact sheet, 2019**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>>. Acesso em: 2 set. 2021.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Eliminate Yellow fever Epidemics (EYE): a global strategy, 2017–2026**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/255703>>. Acesso em: 2 set. 2021a.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Yellow Fever: Strategic Response Plan**. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246103/WHO-YF-ENB-16.2-eng.pdf;jsessionid=0749F95582BB86129DE0CE3489AA4CB6?sequence=1>>. Acesso em: 4 out. 2021b.

WILDER-SMITH, A. et al. Improving clinical management of patients with severe yellow fever. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 7, p. 678–679, 2019.

1. Introduction

Yellow Fever (YF) is a re-emerging acute viral disease transmitted by mosquitos of the genera *Aedes*, *Sabethes* or *Haemagogus* infected with this single-stranded RNA virus that belongs to the *flavivirus* genus [1,2]. Approximately 200,000 cases and 30,000 deaths of YF are annually reported worldwide [3]. The live-attenuated YF-vaccines are the most effective strategies for controlling the disease expansion, available since 1937 and recommended for travelers and residents of areas with YF viral circulation [4,5].

Despite the availability of a safe and effective YF-vaccine, the disease remains endemic in Africa and South America and several large outbreaks have been reported since 2016 [1,6–9]. Facing this alarming epidemiological scenario, the Brazilian Ministry of Health has recently extended the area of YF-vaccination coverage across the country, including areas with low or even without YF viral circulation [10]. As part of the preparedness to introduce the YF-vaccine in regions without YF viral circulation, efforts should be directed at providing scientific evidence to understand the immunogenicity and the duration of immunity in face of factors that affect the 17DD-YF vaccine response.

Although the YF-vaccine is one of the most immunogenic vaccines ever created, previous studies have expanded our understanding about factors that might affect the YF-vaccine responses [11,12,13]. In this sense, it has been proposed that host-related features (age, nutrition, genetics, microbiome) and environmental aspects (endemic vs non-endemic regions, coinfection, heterologous flavivirus exposure) may impact the immune response outcome to YF vaccination [11]. Regarding age, previous reports have shown that both 17D and 17DD YF-vaccines are highly immunogenic in adults, eliciting a remarkably high seroconversion (nearly 100%) upon primary vaccination [12,14,15,16]. Conversely, lower levels of neutralizing antibodies have been reported in children of different ages at primary vaccination, ranging from 77.5% to 90%. In children aging from 9 to 11 months, seroconversion was found to reach a rate as low as 72% [17–20]. As far as the environmental impact on YF-vaccine response, it has been demonstrated that seroconversion rates in non-endemic countries are higher as compared to endemic countries (98.9% vs 94.2%) [12]. Moreover, changes in the immune microenvironment can affect the quantitative and qualitative response to YF-17D vaccine [13]. It has been proposed that frequent exposure to infectious diseases induces a constantly activated immune microenvironment that may lead to strong T-cell exhaustion. These events might affect ultimately the cellular and humoral responses and reduce the efficacy of the YF-17D vaccine [13].

Despite these previous reports, detailed information about the impact of age and environmental exposure to heterologous flaviviruses on the YF-specific humoral and cellular immunity remains to be further elucidated. The goal of this study is to simultaneously assess the immunogenicity and the maintenance of cellular memory immunity triggered by 17DD-YF vaccine, focusing on the influence of pre-existing flavivirus serology in children and adults, residents in areas without previous report of YF viral circulation. The present investigation contributes to the understanding of age-related differences in seroconversion rates and cellular immune responses, providing a comprehensive landscape of supportive evidence to inform public health programs with proxy of protection for areas without YF virus circulation.

2. Population, Material and Methods

2.1. Study population and design

This study is part of a major investigation, which enrolled 4,762 individuals, carried out by the Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine in Paraíba State, Northeast Brazil, an area without previous reports of Yellow Fever virus circulation.

The present investigation comprised of a non-probabilistic sub-sample of 576 individuals from both genders, including: children (n = 288, both genders, age ranging from 9 months to 4 years) and adults (n = 288, both genders, age ranging from 18 to 49 years). The study was conducted in three municipalities, Alhandra, Caa-porã and Conde at Paraíba State, Brazil. This is an observational investigation composed of two independent arms referred as “Flavivirus Serology at Baseline and Immune Response to 17DD-YF Vaccination” and “Age-impact on primary 17DD-YF vaccination Immunity”. The Fig. 1 summarizes the compendium of study population, design, and methods.

The study protocol was submitted and approved by the ethics committees at Universidade Federal da Paraíba (CAAE: 51160215.7.3001.5183) and Instituto René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz (CAAE: 51160215.7.0000.5091). All participants or their legal guardians have read and signed the written/informed consent prior inclusion in the study. This investigation abided by the principles of Helsinki declaration and the 466/2012 resolution from the Brazilian National Health Council for research involving human subjects.

2.2. Biological samples – Serum and mononuclear cell isolation

Blood samples (10–20 mL) were collected from all participants at distinct time points (D0, D30–45 and D365) by venipuncture using gel separation vacuum system without anticoagulant. Samples were submitted to centrifugation at 1000–2000g for 10 min at room temperature. Serum samples were collected and stored at –80°C for further analysis of anti-flavivirus (YFV, DENV and ZIKV) antibody response. Clots were removed from the gel separation system using surgical tweezers and immediately rinsed with RPMI-1640 on a petri dish. Then, clots were cut and disrupted with surgical scissors and then filtered on cell strainer coupled to 50 mL polypropylene tube to remove large fragments and fibrin. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from the minced clots by Histopaque-1077 density gradient by centrifugation at 500g for 40 min, at room temperature. The PBMC layer was collected and washed with cold RPMI-1640. Residual red blood cells were removed by incubation with ammonium chloride buffer for 10 min at room temperature. After an additional wash with cold RPMI-1640, cells were resuspended to a final concentration of 2×10^7 cells/mL. Cells were kept on ice until use for *in vitro* cultures.

2.3. YF neutralizing antibody test

The quantification of YF neutralizing antibodies was performed by micro plaque-reduction neutralization - Horseradish Peroxidase test (μ PRN-HRP), carried out at Laboratório de Tecnologia Viroológica, Bio-Manguinhos (LATEV, FIOCRUZ-RJ, Brazil) according to Simões, M. [21]. Briefly, in 96-well plates, mixture of serial diluted serum samples (1:6 to 1:1458) plus approximately 100 PFU/well of the 17D-213/77 vaccine virus was incubated for 2 h at 37°C, 5% CO₂. After incubation, mixtures were transferred to another 96-well plate containing pre-formed (24 h) Vero CCL-81 ATCC cell

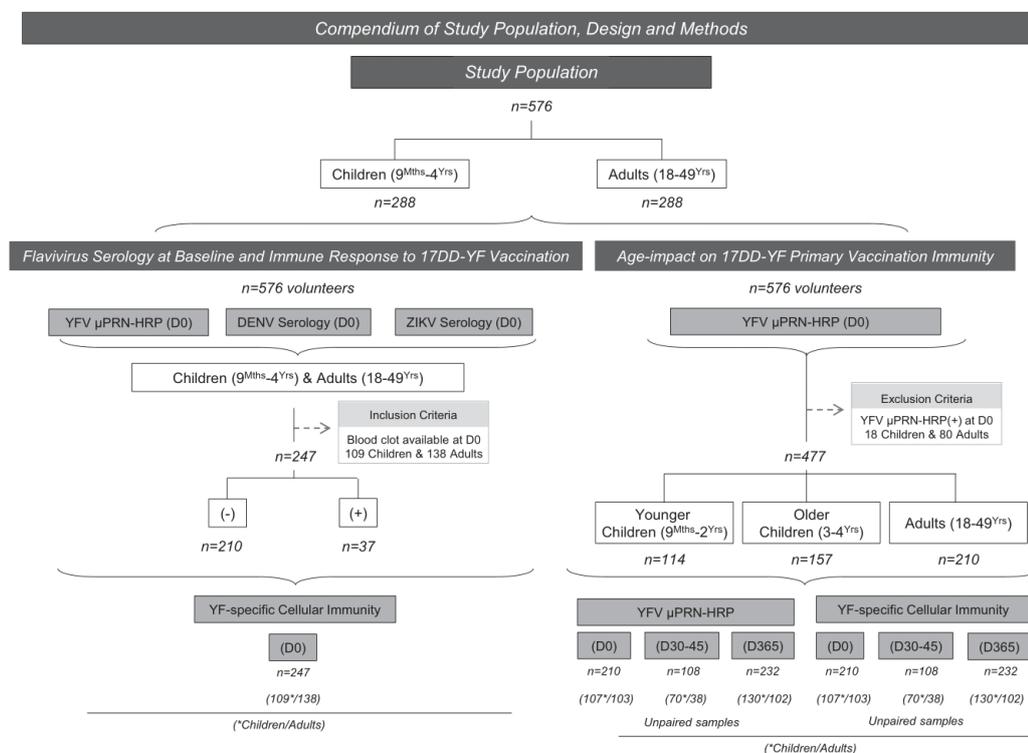


Fig. 1. Compendium of study population, design and methods. The study population comprises 576 volunteers including: children (n = 288, both genders, age ranging from 9 months to 4 years) and adults (n = 288, both genders, age ranging from 18 to 49 years). This is an observational investigation carried out in an area without circulation of Yellow Fever virus in Brazil composed of two independent arms. The flowchart summarizes the experimental designs and methods of each arm. The first arm ("Flavivirus Serology at Baseline and Immune Response to 17DD-YF Vaccination") intended to evaluate the impact of previous flavivirus serology status - "YFV neutralizing antibodies (D0)", "DENV Serology (D0)" and "ZIKV Serology (D0)" - on YF-specific cellular immunity (D0) in samples from Children (9^{Mths}-4^{Yrs}) and Adults (18-49^{Yrs}) categorized as: (-) and (+) according to flavivirus serology status at baseline. The second arm ("Age-impact on primary 17DD-YF vaccination Immunity") aimed at determining the age-impact on primary 17DD-YF vaccination based on the analysis of YFV neutralizing antibodies - μ PRN-HRP (D0; D30-45 and D365) and YF-specific cellular immunity (D0; D30-45 and D365) in samples from Younger Children (9^{Mths}-2^{Yrs}) and Older Children (3-4^{Yrs}) and Adults (18-49^{Yrs}). In this arm, volunteers with positive YFV neutralizing antibodies - μ PRN-HRP were excluded (18 children and 80 adults).

monolayer for adsorption step during 1 h at 37°C, 5% CO₂. Following the mixtures were removed and replaced by 2% carboxymethylcellulose semisolid medium (CMC) followed by incubation for 48 h at 37°C, 5% CO₂. Thereafter, the monolayers were washed and fixed with ethanol/methanol (1:1) solution for 1 h and 30 min at -20°C. After the fixation step, the HRP-conjugated monoclonal antibody (4G2) diluted in the blocking solution (0.5% BSA, 0.5% casein prepared in distilled water) was added to each well and plates incubated for 2 h at 35°C and 5% CO₂. Subsequently, cell monolayers were washed with Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) before addition of True Blue Dye (TB) substrate. After 15 min of incubation in the dark at room temperature, the cell monolayers were washed in distilled water, dried and photographed using the automated image acquisition system previously described by Denanani et al., 2020 [22] and plaques were counted manually. Neutralizing antibody titers were expressed by 50% of plaque reduction comparing to virus control. Seropositivity rate was calculated considering the antibody titer ≥ 100 as the cut-off. Results ≤ 70 were considered negative and those within 71 and 99 comprises the indeterminate gray zone. These cut-off edge and gray zone were defined by Simões, M. [21], using the Receiver Operating-Characteristics (ROC) curve

using a range of serum samples that previously tested negative or positive on the classical micro plaque-reduction neutralization test (PRNT₅₀).

2.4. DENV IgG ELISA

The analysis of anti-DENV IgG was carried out at Laboratório de Tecnologia Imunológica, Bio-Manguinhos (LATIM, FIOCRUZ-RJ, Brazil) using a commercially available ELISA kit (Panbio dengue IgG indirect ELISA kit, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA) according to the manufacturer instructions. The results were expressed as relative units/mL.

2.5. ZIKV IgG rapid test

The analysis of anti-ZIKV IgG was carried out at Laboratório de Flavivírus, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ-RJ, Brazil) using a commercially available kit (TR DPP[®] Zika IgM/IgG - Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), according to the manufacturer instructions. The results were expressed as band intensity provided by a microreader device available from the manufacturer.

2.6. Long-term *in vitro* cultures of peripheral blood mononuclear cells

Long-term PBMC cultures were carried out at Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou (IRR/FIOCRUZ-Minas, Brazil) as previously described by Costa-Pereira et al. (2018) [23]. Briefly, replicates of cultures ($5.0 \times 10^5/25 \mu\text{L}$ /well) were incubated in the presence of $100 \mu\text{L}/\text{well}$ RPMI-1640 supplemented with 5% heat-inactivated AB normal human serum, 10,000 IU/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 0.025 mg/mL amphotericin B and 2 mM L-glutamine. Parallel batches of unstimulated Control Culture (CC) and 17DD-YF antigen-stimulated cultures (17DD-YF Ag) were carried out by addition of $100 \mu\text{L}/\text{well}$ of RPMI-1640 or 17DD-YF vaccine ($250 \text{ LD}_{50}/\text{well}$). Cultures were incubated for 6 days at 37°C in humidified 5% CO_2 atmosphere. Thereafter, cultures were treated with Brefeldin-A (0.01 mg/mL) for 4 h then incubated with 2 mM ethylenediamine-tetra-acetic acid for 15 min at room temperature. Following, cells were harvested and washed twice with phosphate-buffered saline – PBS, supplemented with 0.5% bovine serum albumin, 0.1% sodium azide (FACS buffer). Cell suspensions were adjusted to 1×10^6 cells/mL with FACS buffer for immunophenotypic analysis.

2.7. Analysis of YF-specific memory T and B-cells

The phenotypic analysis of memory T and B-cells was performed as previously described by Costa-Pereira et al. (2018) [23]. Briefly, following long-term *in vitro* PBMC cultures, cultured cells were harvested, and aliquots (1×10^6 cells/mL) stained with Live/Dead Dye (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Next, incubation with a mix of monoclonal antibodies (mAbs) to cell surface molecules was performed to identify the memory status of T and B-cell subsets, comprising of: anti-CD3/SK7/APC-Cy7; anti-CD4/RPA-T4/FITC; anti-CD8/SK1/PerCP-Cy5.5; anti-CD27/M-T271/PE; anti-CD45RO/UCLH1/PE-Cy7; anti-CD183/1C6/APC for T-cell immunostaining and anti-IgD/IA6-2/FITC, anti-CD27/M-T271/PE and anti-CD19/HIB19/PerCP-Cy5.5 for B-cell analysis. All monoclonal antibodies were purchased from BD Bioscience (San Jose, CA, USA). Stained cells were washed once with FACS buffer and data acquired on a BD LSR Fortessa flow cytometer (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Flowjo software (version 10.8, TreeStar, San Diego, CA, USA) was used to establish distinct gating strategies to quantify the memory T and B-cell subpopulations. A range of memory T-cell phenotypic features was evaluated including: Naïve ($\text{N} = \text{CD}27^+ \text{CD}45\text{RO}^-$), Early Effector ($\text{eE} = \text{CD}27^+ \text{CD}45\text{RO}^+$), Central Memory ($\text{CM} = \text{CD}27^+ \text{CD}45\text{RO}^+$), Effector Memory ($\text{EM} = \text{CD}27^- \text{CD}45\text{RO}^+$), Naïve* ($\text{N}^* = \text{CD}183^- \text{CD}45\text{RO}^-$), Early Activated ($\text{eA} = \text{CD}183^+ \text{CD}45\text{RO}^-$), Non-Interferon Mediated ($\text{nIFN-M} = \text{CD}183^- \text{CD}45\text{RO}^+$), Interferon-Mediated ($\text{IFN-M} = \text{CD}183^+ \text{CD}45\text{RO}^+$) $\text{CD}4^+$ and $\text{CD}8^+$ T-cells. B-cell analysis included: Naïve ($\text{N} = \text{CD}19^+ \text{CD}27^- \text{IgD}^+$), Early Effector ($\text{eE} = \text{CD}19^+ \text{CD}27^- \text{IgD}^-$), Non-classical Memory ($\text{nCM} = \text{CD}19^+ \text{CD}27^+ \text{IgD}^+$) and Classical Memory ($\text{CM} = \text{CD}19^+ \text{CD}27^+ \text{IgD}^-$). The results were first obtained as percentage of each cell phenotype and further converted into 17DD-YF Culture/Control Culture Index, calculated as the ratio of results observed in the 17DD-YF cultures divided by the respective Control Culture.

2.8. Data analysis

Multiple strategies were applied for data analysis. Comparative analysis between flavivirus antibody reactivity (geometric mean titer, GMT) and seropositivity rates (proportion, %) were carried out by Student *t*-test, and Chi-square test, respectively. Multiple comparisons amongst antibody reactivity (GMT) were carried out by ANOVA followed by Tukey post-test for post-hoc pairwise comparisons. Mann-Whitney test was performed for comparative anal-

ysis of memory T and B-cell status between groups. Multiple comparative analysis of memory T and B-cell status amongst subgroups was carried out by Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test for post-hoc pairwise comparisons. In all cases, significant differences were considered at $p < 0.05$.

Biomarker signatures were constructed for Younger Children ($9^{\text{Mths}}\text{-}2^{\text{Yrs}}$), Older Children ($3\text{-}4^{\text{Yrs}}$) and Adults ($18\text{-}49^{\text{Yrs}}$) as previously described by Luiza-Silva et al. (2011) [24]. For this purpose, the results of memory T and B-cell status, expressed as 17DD-YF Culture/Control Culture Index, were first converted into categorical data using the global median values for each biomarker as the cut-off edge to identify subjects with low and high index. Following, ascendant biomarker signatures obtained for each subgroup at D0, D30-45 and D365 upon primary 17DD-YF vaccination were employed to underscore those biomarkers with more than 50% of subjects above the global median cut-off. Overlaid biomarker signatures were assembled for comparative analysis amongst D0, D30-45 and D365. Venn diagram analysis (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) was performed to identify common and selective biomarkers observed for Younger Children ($9^{\text{Mths}}\text{-}2^{\text{Yrs}}$), Older Children ($3\text{-}4^{\text{Yrs}}$) and Adults ($18\text{-}49^{\text{Yrs}}$) at D0, D30-45 and D365 upon primary 17DD-YF vaccination.

3. Results

3.1. Flavivirus serological status of children and adults prior 17DD-YF vaccination

In the first arm of this study, the antibody reactivity to YFV, DENV and ZIKV was measured to evaluate the pre-existing humoral immunity to flavivirus in the study population, and the results are presented in the Fig. 2. Data analysis showed that higher levels of YFV neutralizing antibodies, DENV IgG and ZIKV IgG were observed in Adults ($18\text{-}48^{\text{Yrs}}$) as compared to Children ($9^{\text{Mths}}\text{-}4^{\text{Yrs}}$). Moreover, that seropositivity rates to YFV, DENV and ZIKV were higher (26%, 87% and 67% vs 6%, 13% and 15%, respectively) in Adults ($18\text{-}48^{\text{Yrs}}$) as compared to Children ($9^{\text{Mths}}\text{-}4^{\text{Yrs}}$).

3.2. Flavivirus serological status at baseline and YF-specific cellular response prior 17DD-YF vaccination

In order to verify whether the status of flavivirus serology at baseline is associated with distinct pattern of YF-specific cellular response prior to 17DD-YF vaccination, the study population was classified according to the anti-YFV, DENV and ZIKV antibody status (– or +) and the YF-specific cellular response measured prior to 17DD-YF vaccination. The results are shown in the Fig. 3. Data analysis demonstrated that positive serology for all three flavivirus was associated with lower levels of NCD8 and CMCD8, but higher levels of eE/CD19 cells. Noteworthy was that the pre-existing seropositivity to YFV was associated with higher levels of NCD4, EMCD8, IFN-MCD8, NCD19 and nCMCD19 at baseline as compared to participants with seronegative status for YFV as well as for DENV or ZIKV (Fig. 3).

3.3. Age-impact on YF-neutralizing antibodies upon primary 17DD-YF vaccination

In the second arm of the present investigation, the YF-specific neutralizing antibody titers and the seropositivity rates were measured in Younger Children ($9^{\text{Mths}}\text{-}2^{\text{Yrs}}$), Older Children ($3\text{-}4^{\text{Yrs}}$) and Adults ($18\text{-}49^{\text{Yrs}}$) at baseline (D0), as well as at day 30-45 (D30-45) and day 365 (D365) upon primary 17DD-YF vaccination. The results are presented in the Fig. 4. Overall data analysis showed that the primary 17DD-YF vaccination induced an increase in the

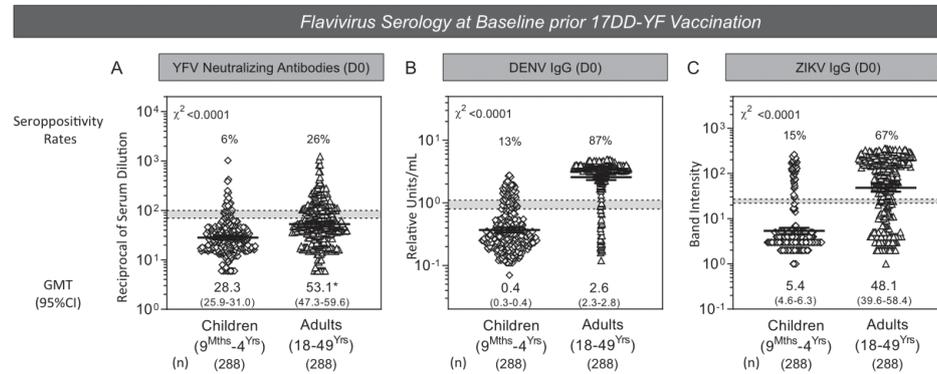


Fig. 2. Flavivirus serology at baseline prior 17DD-YF vaccination. (A) YF-specific neutralizing antibodies, (B) DENV IgG and (C) ZIKV IgG were measured in Children (9^{Mths}-4^{Yrs}) (◇) and Adults (18-49^{Yrs}) (△) at baseline (D0). YF-specific neutralizing antibodies were detected by micro plaque-reduction neutralization test/Horseradish Peroxidase (YFV neutralizing antibodies - μPRN-HRP) as described in Material and Methods. The antibody titers are expressed as the reciprocal of the last serum dilution that reduced the number of lysis plaques by 50% (EP₅₀) as compared to control. Seropositivity rate was calculated considering the antibody titer ≥ 100 as the cut-off. Results ≤ 70 were considered negative and those within 71 and 99 comprises the indeterminate gray zone. DENV IgG were measure by commercially available Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) as described in Material and Methods. The results are expressed as Relative Units/mL. The seropositivity rates were calculated considering the antibody levels > 1.1 as the cut-off. Results < 0.80 were considered negative and those within 0.80 and 1.1 comprises the indeterminate gray zone. ZIKV IgG were measure by commercially available Rapid Test as described in Material and Methods. The results are expressed as Band Intensity. The seropositivity rates were calculated considering the band intensity > 27 as the cut-off. Results < 22 were considered negative and those within 22 and 27 comprises the indeterminate gray zone. Data are presented as scattering of individual values and geometric mean titer plus 95% confidence interval (GMT, 95 %CI) for Children (9^{Mths}-4^{Yrs}) and Adults (18-49^{Yrs}) at baseline (D0). The seropositivity rates are provided in the figure. In all cases, significant differences were considered at $p < 0.05$ and underscored by **** for comparison with Children (9^{Mths}-4^{Yrs}).

levels of YF-neutralizing antibodies at D30-45 (GMT = 551, 738 and 1,106, respectively) with a progressing decline towards D365 (GMT = 341, 391 and 819, respectively), regardless the age subgroup. In general, the levels of YF-specific neutralizing antibodies were higher in Adults (18-49^{Yrs}) at D30-45 (GMT = 1,106) as compared to Younger Children (9^{Mths}-2^{Yrs}) (GMT = 551). Moreover, at D365 the levels of neutralizing antibodies were higher in adults as compared to both children's subgroups (GMT = 819 vs 345 and 391, respectively) (Fig. 4). Furthermore, the seropositivity rates in Younger Children (9^{Mths}-2^{Yrs}), Older Children (3-4^{Yrs}) and Adults (18-49^{Yrs}) achieve similar levels at D30-45 (94%, 95% and 100%, respectively). Substantial decrease was reported at D365 particularly in young children as compared to the other subgroups (87%, 96% and 99%, respectively) (Fig. 4).

3.4. Age-impact on YF-specific memory T and B-cells upon primary 17DD-YF vaccination

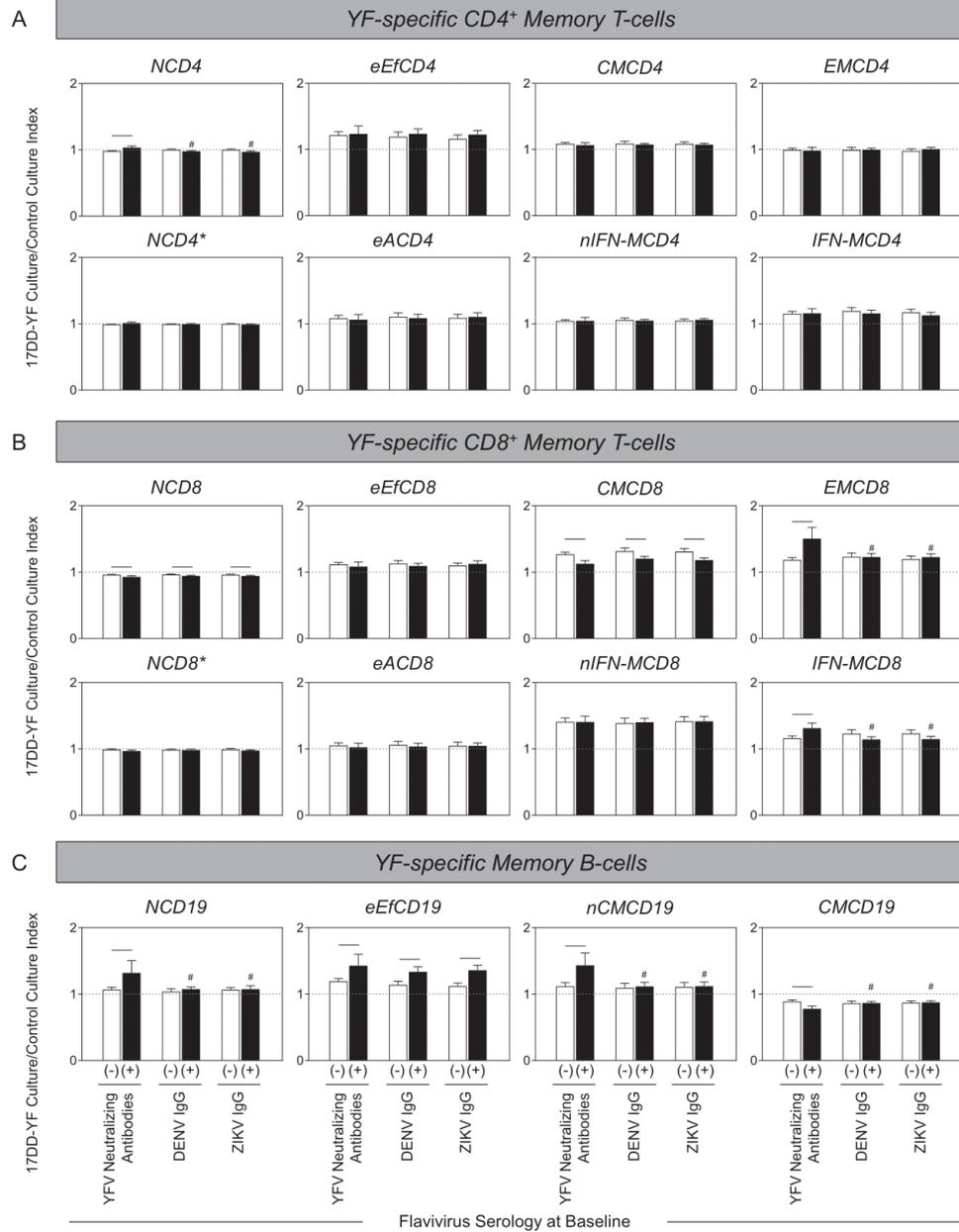
The analysis of YF-specific memory status within T and B-cells was evaluated following long-term *in vitro* antigen recall and the results are presented in the Figs. 5 and 6. Data analysis demonstrated that regardless the age subgroup, the primary 17DD-YF vaccination induced a persistent increase of eEfCD4 and IFN-MCD8 at D30-45 and D365 as compared to baseline (D0). Moreover, an increase in EMCD4 was observed in all subgroups at D30-45, returning to basal levels at D365. Conversely, all subgroups exhibited a persistent decrease of eEfCD8 and CMCD8 at D30-45 and D365 as compared to baseline (D0). Particularly, a decrease in nIFN-MCD4 was observed in Younger Children (9^{Mths}-2^{Yrs}) at D365 as compared to Older Children (3-4^{Yrs}) and Adults (18-49^{Yrs}). Changes in NCD4 and NCD8 was observed exclusively in adults as compared to both children's subgroups (Fig. 5). Of note, primary 17DD-YF vaccination elicited at D30-45 an increase of EMCD8 in all subgroups. However, only Younger Children (9^{Mths}-2^{Yrs}) presented a later decline in EMCD8 at D365 (Fig. 5). The analysis of memory B cells demonstrated that all subgroups presented

increased levels of nCMCD19 at D30-45 as compared to D0 with progressive decline towards D365 (Fig. 6).

3.5. Biomarker signatures further demonstrated Age-related impact on YF-specific memory T and B-cells upon primary 17DD-YF vaccination

The biomarker signature patterns of memory T and B-cells were assembled as ascendant curves at D0, D30-45 and D365 in order to take a snapshot of the overall immune response observed in children and adults. For this purpose, the results (17DD-YF Culture/Control Culture Index) were converted into categorical data as described in Material and Methods and the proportion of subjects with high index assembled in ascendant curves (Fig. 7). The biomarkers reaching more than 50% of subjects above the global median were underscored as the hallmarks of each subgroup. Data analysis showed that upon primary 17DD-YF vaccination, all subgroups presented at D30-45 an increase proportion of subjects with high levels of EMCD8, IFN-MCD8 and nCMCD19 as compared to D0. While all subgroups presented increased proportion of subjects with high levels of eEfCD4 and INF-MCD8, only Older Children (3-4^{Yrs}) and Adults (18-49^{Yrs}) persisted with high levels of EMCD8 at D365 (Fig. 7). Venn diagrams further illustrated the major differences observed amongst the age subgroups. Comparative analysis within age subgroups along the vaccination timeline, revealed that Younger Children (9^{Mths}-2^{Yrs}) presented increased levels of IFN-MCD8 at D30-45 and D365, but the high levels of EMCD8 was restricted to D30-45 and lost at D365. The Older Children (3-4^{Yrs}) and Adults (18-49^{Yrs}) exhibited a more robust response to the primary 17DD-YF vaccination with IFN-MCD8 and EMCD8 profile consistently increased at D30-45 and D365 (Fig. 8A). Comparative analysis amongst age subgroups at specific timepoints after primary 17DD-YF vaccination further underscores that EMCD8, IFN-MCD8 and nCMCD19 at D30-45 and eEfCD4 and IFN-MCD8 at D365 are universal biomarkers found in all subgroups. Notably, only Older Children (3-4^{Yrs}) and Adults (18-49^{Yrs}) presented an elevated EMCD8 profile up to D365 (Fig. 8B).

Flavivirus Serology and YF-specific Cellular Response at Baseline



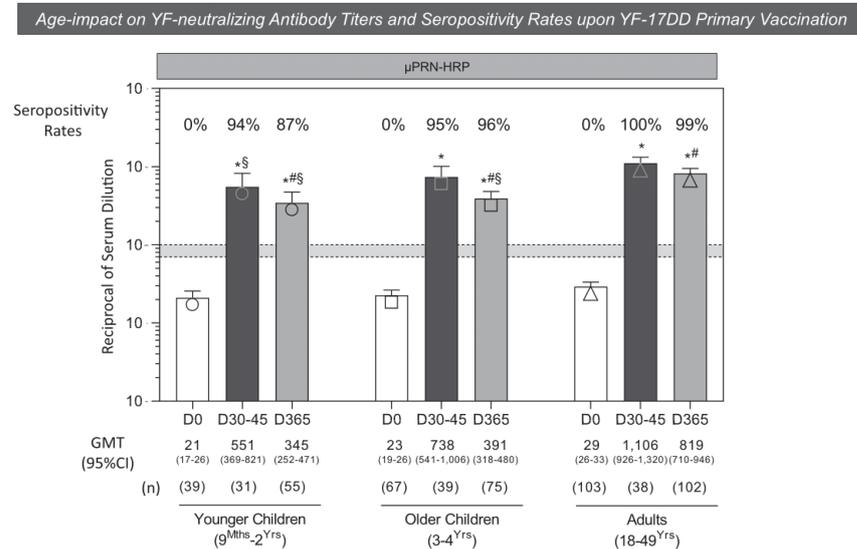


Fig. 4. Age-impact on YF-neutralizing antibody titers and seropositivity rates upon primary 17DD-YF vaccination. YF-specific neutralizing antibodies were measured in Younger Children (9^{Mths}-2^{Yrs})(○;●;⊙), Older Children (3-4^{Yrs})(□;■;▣) and Adults (18-49^{Yrs})(△;▲;▴) at baseline (D0) as well as at day 30-45 (D30-45) and day 365 (D365) upon primary 17DD-YF vaccination. YF-specific neutralizing antibodies were detected by micro plaque-reduction neutralization test/Horseradish Peroxidase (YFV neutralizing antibodies - μPRN-HRP) as described in Material and Methods. The antibody titers are expressed as the reciprocal of the last serum dilution that reduced the number of lysis plaques by 50% (EP₅₀) as compared to control. Seropositivity rate was calculated considering the antibody titer ≥ 100 as the cut-off. Results ≤ 70 were considered negative and those within 71 and 99 comprises the indeterminate gray zone. Data are presented as geometric mean titer plus 95% confidence interval (GMT, 95% CI) for Younger Children (9^{Mths}-2^{Yrs}), Older Children (3-4^{Yrs}) and Adults (18-49^{Yrs}). The seropositivity rates are provided in the figure. Comparative analysis of antibody reactivity and seropositivity rates were carried out by ANOVA followed by Tukey post-test for multiple comparisons and Chi-square test, respectively. In all cases, significant differences were considered at p < 0.05 and underscored by “”, “#” for intragroup comparison with D0 and D30-45 and “\$” for intergroup comparison with Adults (18-49^{Yrs}), respectively.

4. Discussion

YF remains a threat to global health, with increasing frequency of severe outbreaks in the tropical areas over the recent past. These re-emergence events have been reported in areas with historically low or no YF virus circulation. This suggests that the vaccination coverage should not be limited only to areas with YF virus circulation [25]. In this context, recently the Brazilian Ministry of Health expanded the recommendation of YF vaccine coverage across the country, since in cases of outbreaks, residents of areas with low or without YF virus circulation are vulnerable to YF infection due to reduced vaccination coverage [10].

Aiming at providing supportive evidence to further understand the immune response to 17DD-YF vaccine in areas without circulation of YF virus, the present investigation provided a conspicuous and clear landscape of the humoral and cellular immunity in face

of factors that affect the 17DD-YF vaccine response. We have assessed the impact of age and previous exposure to heterologous flavivirus infections on the immunogenicity and the duration of immunity induced by 17DD-YF vaccine.

The results demonstrated that seropositivity rates to YFV, DENV and ZIKV were higher in adults as compared to children. We believe that the higher seropositivity rates for heterologous flavivirus observed in adults may reflect the higher exposure over-time. To assess the impact of previous flavivirus serology (YFV, DENV and ZIKV) in YF-specific cellular response, several memory-related biomarkers were evaluated in peripheral blood samples upon 17DD-YF antigen recall *in vitro*. Our results showed that only pre-existing seropositivity to YFV was associated with higher levels YF-specific biomarkers (NCD4, EMCD8, IFN-MCD8, NCD19 and nCMCD19) at baseline as compared to YFV-seronegative participants. No selective differences were observed

Fig. 3. Flavivirus serology and YF-specific cellular response at baseline. YF-specific cellular response was measured in Children (9^{Mths}-4^{Yrs}) and Adults (18-49^{Yrs}) at baseline (D0). YF-specific cellular response was evaluated upon *in vitro* 17DD-YF antigen recall of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) followed by flow cytometric immunophenotypic staining to quantify memory T and B-cells as described in Material and Methods. The results are expressed as 17DD-YF Ag/CC Index. The Index = 1 was underscored as the threshold (dashed line). Data are presented as median index (75th interquartile range) observed for the study population (children + adults) at baseline (D0), considering the impact of the baseline status (D0) of YFV neutralizing antibodies - μPRN-HRP (-)/(□) vs (+)/(■), DENV IgG (-)/(□) vs (+)/(■) and ZIKV IgG (-)/(□) vs (+)/(■) on the YF-specific memory CD4⁺ (A), CD8⁺ T-cells (B) and B-cells (C). A range of T-cell phenotypic features was evaluated including: Naïve (N = CD27⁻CD45RO⁻), Early Effector (eEf = CD27⁻CD45RO⁻), Central Memory (CM = CD27⁺CD45RO⁺), Effector Memory (EM = CD27⁻CD45RO⁺), Naïve* (N* = CD183⁻CD45RO⁻), Early Activated (eA = CD183⁺CD45RO⁻), Non-Interferon Mediated (nIFN-M = CD183⁻CD45RO⁻), Interferon-Mediated (IFN-M = CD183⁺CD45RO⁻) CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. B-cell analysis included: Naïve (N = CD19⁺CD27⁻IgD⁻), Early Effector (eEf = CD19⁺CD27⁻IgD⁻), Non-classical (nCM = CD19⁺CD27⁺IgD⁺) and Classical Memory (CM = CD19⁺CD27⁺IgD⁺). Comparative analysis between subgroups was carried out by Mann-Whitney test. In all cases, significant differences were considered at p < 0.05 and underscored by connecting lines and “#” for intragroup and intergroup comparisons, respectively.

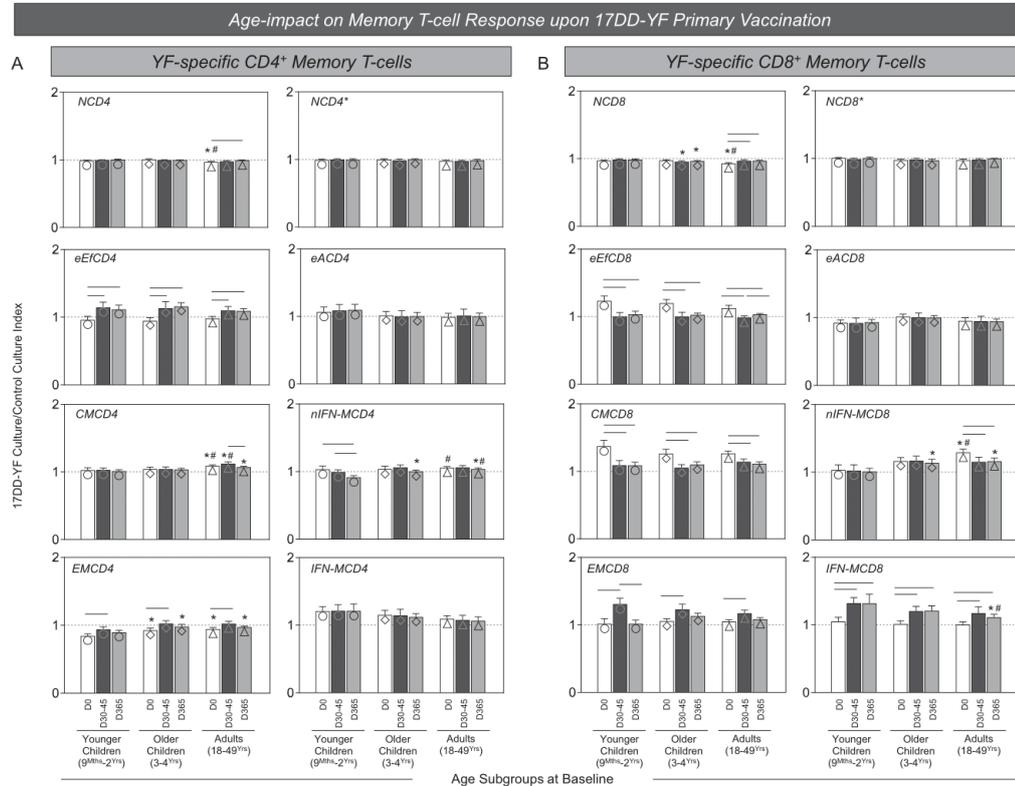


Fig. 5. Age-impact on memory T-cell response upon primary 17DD-YF vaccination. YF-specific cellular response was measured in Younger Children ($9^{\text{Mths-2Yrs}}$)(○;●;●), Older Children ($3-4^{\text{Yrs}}$)(□;■;■) and Adults ($18-49^{\text{Yrs}}$)(△;▲;▲) at baseline (D0) as well as at day 30–45 (D30-45) and day 365 (D365) upon primary 17DD-YF vaccination. YF-specific cellular response was evaluated upon *in vitro* 17DD-YF antigen recall of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) followed by flow cytometric immunophenotypic staining to quantify memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cells as described in Material and Methods. The results are expressed as 17DD-YF Ag/CC Index. The Index = 1 was considered as the threshold (dashed line). Data are presented as median index (75th interquartile range) observed for Younger Children ($9^{\text{Mths-2Yrs}}$), Older Children ($3-4^{\text{Yrs}}$) and Adults ($18-49^{\text{Yrs}}$) to evaluate the age-impact on the YF-specific memory CD4⁺ (A) and CD8⁺ T-cells (B). A range of T-cell phenotypic features was evaluated including: Naive (N = CD27⁺CD45RO⁻), Early Effector (eE = CD27⁺CD45RO⁺), Central Memory (CM = CD27⁺CD45RO⁺), Effector Memory (EM = CD27⁻CD45RO⁺), Naive* (N* = CD183⁻CD45RO⁻), Early Activated (eA = CD183⁺CD45RO⁻), Non-Interferon-Mediated (nIFN-M = CD183⁻CD45RO⁻), Interferon-Mediated (IFN-M = CD183⁺CD45RO⁺) CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Comparative analysis amongst subgroups was carried out by Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test for multiple comparison. In all cases, significant differences were considered at $p < 0.05$ and underscored by connecting lines, "" or "" for intragroup comparison and comparative analysis with Younger Children ($9^{\text{Mths-2Yrs}}$) and Older Children ($3-4^{\text{Yrs}}$), respectively.

for YF-specific cellular immunity when considering the seropositivity status for DENV or ZIKV.

To the best of our knowledge, there are scarce reports describing the impact of flaviviruses serology on YF-specific vaccine cellular response. Most of the studies have focused in evaluating the cross-reactivity of neutralizing antibodies amongst YF and other flaviviruses [26–29]. Campi-Azevedo et al. (2019) have demonstrated that pre-existing humoral response to DENV did not affect cellular immunity over time after secondary vaccination [30]. The concomitant presence of YF-specific cellular response herein observed at baseline amongst YFV-seropositive subjects may represent a state of immune activation memory induced by previous YF vaccination and not pre-exposure to wild-type YFV, since the present investigation was carried out in an area without YF virus circulation. Of note was that most subjects identified with YFV-seropositive at baseline were adults in comparison to children, that might not be aware of their YF vaccine status or may have lost their vaccination card. The possibility of cross-reactivity was also

considered. However, Grifoni et al. (2020) have tested the cross-reactivity of T-cell responses to flavivirus in subjects previously exposed to DENV and further immunized with the 17D-YF vaccine and demonstrated a limited degree of cross-reactivity for both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses between flavivirus [31].

In the second arm of this study, the YF-specific neutralizing antibody titers and the seropositivity rates were measured to understand the age-impact on primary 17DD-YF vaccination. Our results demonstrate that the seropositivity rates achieved similar levels in Younger Children ($9^{\text{Mths-2Yrs}}$), Older Children ($3-4^{\text{Yrs}}$) and Adults ($18-49^{\text{Yrs}}$) at D30-45 with substantial decrease reported towards D365 in Younger Children ($9^{\text{Mths-2Yrs}}$). However, the levels of neutralizing antibodies were significantly lower in children as compared to adults. Reports from de Noronha et al. (2019), in an investigation to assess the duration of post-vaccination humoral immunity against yellow fever in children, showed a substantial reduction in the proportion of seropositivity to YF vaccine, as well as a lower seropositivity rates in newly

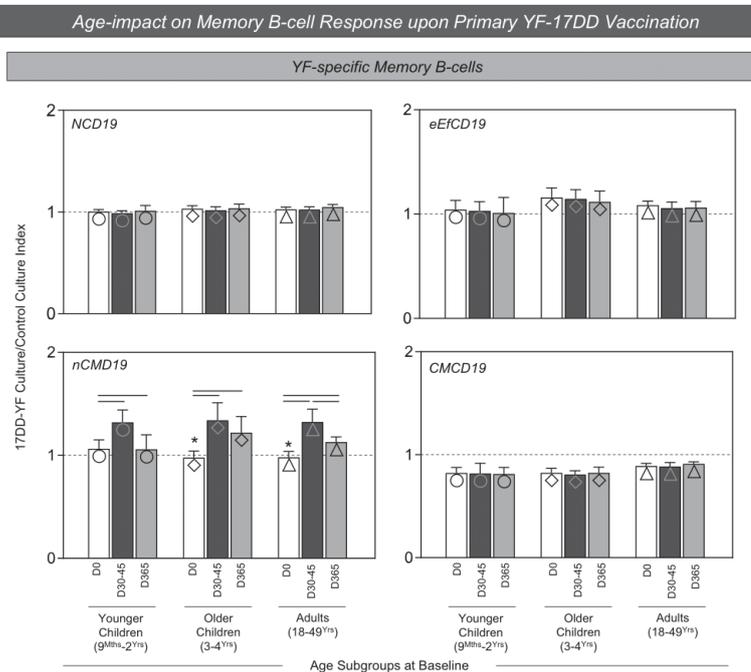


Fig. 6. Age-impact on memory B-cell response upon primary 17DD-YF vaccination. YF-specific cellular response was measured in Younger Children (9^{Mths-2}Yrs) (○; ●; ○), Older Children (3-4^{Yrs}) (□; ■; □) and Adults (18-49^{Yrs}) (△; ▲; △) at baseline (D0) as well as at day 30-45 (D30-45) and day 365 (D365) upon primary 17DD-YF vaccination. YF-specific cellular response was evaluated upon *in vitro* 17DD-YF antigen recall of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) followed by flow cytometric immunophenotypic staining to quantify memory B-cells as described in Material and Methods. The results are expressed as 17DD-YF Ag/CC Index. The Index = 1 was considered as the threshold (dashed line). Data are presented as median index (75th interquartile range) observed for Younger Children (9^{Mths-2}Yrs), Older Children (3-4^{Yrs}) and Adults (18-49^{Yrs}) to evaluate the age-impact on the YF-specific memory B-cells. A range of phenotypic features was evaluated including: Naive (N = CD19⁺CD27⁻IgD⁻), Early Effector (eEf = CD19⁺CD27⁺IgD⁻), Non-classical (nCM = CD19⁺CD27⁺IgD⁻) and Classical Memory (CM = CD19⁺CD27⁺IgD⁻). Comparative analysis between subgroups was carried out by Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-test for multiple comparison. In all cases, significant differences were considered at $p < 0.05$ and underscored by connecting lines, "" or ""#"" for intragroup comparison and comparative analysis with Younger Children (9^{Mths-2}Yrs) and Older Children (3-4^{Yrs}), respectively.

vaccinated infants [32]. Campi-Azevedo et al. (2019) also demonstrated a time-dependent decrease in neutralizing antibody titers in YF primary children vaccinees reaching critical seropositivity rates at 1-year after vaccination [30]. Our results agree with these findings, indicating a substantial decline of neutralizing antibodies post-vaccination in children, supporting a short-term immunity to YF-vaccine in this age subgroup. Other studies have shown this drastic decrease in neutralizing antibody titers in children [15,20,33,34], indicating that a substantial fraction of children might be vulnerable to YF virus infection due to expansion of YF virus circulation areas.

The analysis of age-impact on YF-specific memory T and B-cells upon 17DD-YF vaccination demonstrated that regardless the age subgroup, the primary vaccination elicited an increase of EMCD8 and nCMCD19 in all subgroups at D30-45 as compared to D0. Several studies strongly support the relevance of memory CD8⁺ T cells for immune protection upon YF vaccination [23,35-38]. Previous reports from Costa-Pereira et al. (2018) and Campi-Azevedo et al. (2019) have demonstrated that primary 17DD-YF vaccination promotes an increase of memory T-cells and B-cells [23,30]. Distinct subsets of CD8⁺ T-cells expand upon antigen recall [39]. Effector T-cells dominate this expansion phase. Effector memory T-cells preferentially home to peripheral tissues and respond to antigen recall with immediate effector functions, whereas central memory T-cells home to lymphoid organs and can strongly expand upon

antigen recall [40]. Memory B-cells are also elicited in response to vaccination providing protection upon re-exposure to the same antigen stimuli [41]. These cells can differentiate into antibody-secreting cells to provide an immediate source of antibodies or they can enter in germinal centers to respond to pathogen-related antigens [41,42]. Over the past decade, several studies have shown that the memory B-cell compartment in humans is highly heterogeneous. Both switched immunoglobulin and immunoglobulin M (IgM+) memory cells have been described, as well as "atypical" memory B-cells that lack expression of the surface marker CD27 [42]. Our findings suggest that the participation of memory T and B-cells are relevant in defining proxies of immune protection after 17DD-YF vaccination.

Our results demonstrated that several cellular memory-related biomarkers identified at D30-45 remained stable at D365 amongst all age subgroups. However, a clear decline in magnitude was observed in children, especially in Younger Children (9^{Mths-2}Yrs). Of note was the decline in EMCD8 at D365 observed in Younger Children (9^{Mths-2}Yrs). The studies that evaluated the duration of YF-specific immunity triggered by primary vaccination in children are still scarce. Previous studies from our group have demonstrated a short-lived persistence of memory T and B-cells (EMCD4, EMCD8, nCMCD19) in children with critical values observed at 4-years after primary vaccination [39]. The early decline of EMCD8 herein observed in Younger Children (9^{Mths-2}Yrs) reinforces the relevance

Biomarker Signatures after 17DD-YF Primary Vaccination in Children and Adults

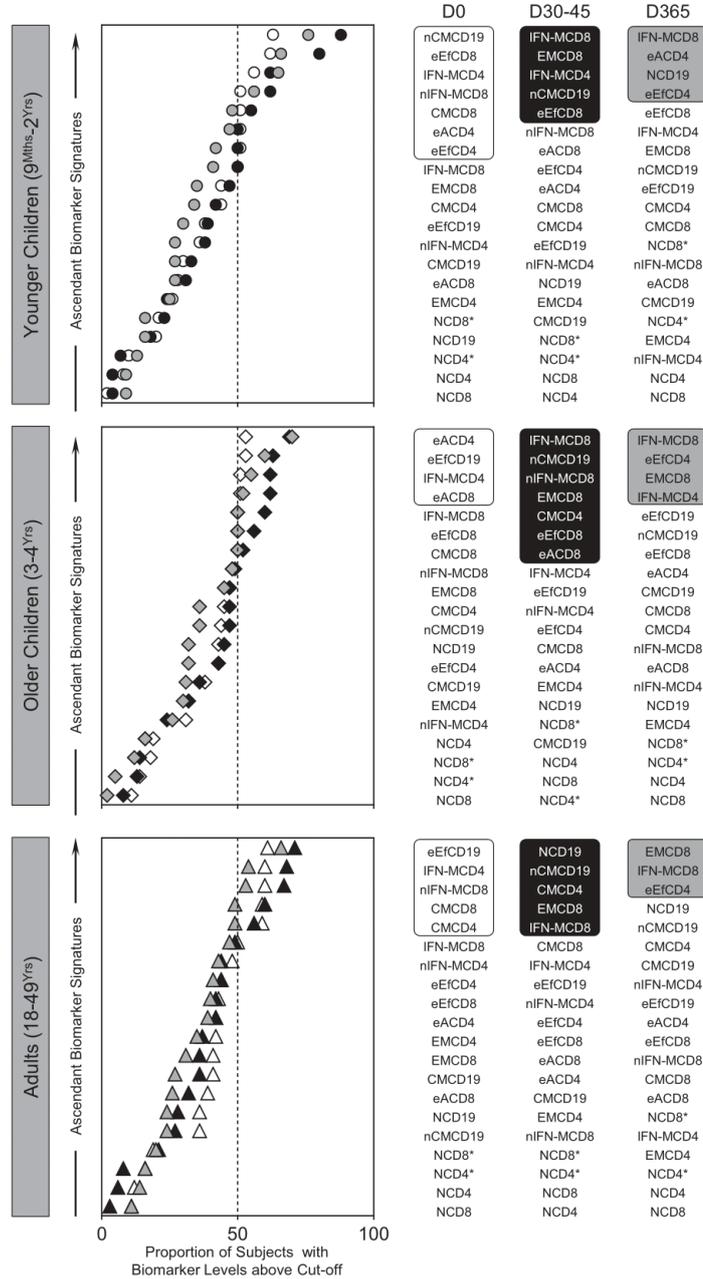


Fig. 7. Biomarker signatures after primary 17DD-YF vaccination in children and adults. Biomarker signatures were assembled for Younger Children (9^{Mths-2}Yrs) (○; ●; ◐; ◑), Older Children (3-4^{Yrs}) (□; ■; ◑; ◒) and Adults (18-49^{Yrs}) (△; ▲) at baseline (D0) as well as at day 30-45 (D30-45) and day 365 (D365) upon primary 17DD-YF vaccination. For this purpose, the results (17DD-YF Culture/Control Culture Index) were converted into categorical data based on the global median cut-offs of each biomarker as described in Material and Methods. Thereafter, the proportion of subjects with high index were assembled in ascendant curves. The biomarker signatures obtained for each subgroup were employed to underscore those biomarkers (rectangular frames) with more than 50% of subjects above the global median cut-off (dashed line) at D0, D30-45 and D365 upon primary 17DD-YF vaccination. Overlaid biomarker signatures were assembled for comparative analysis amongst D0, D30-45 and D365.

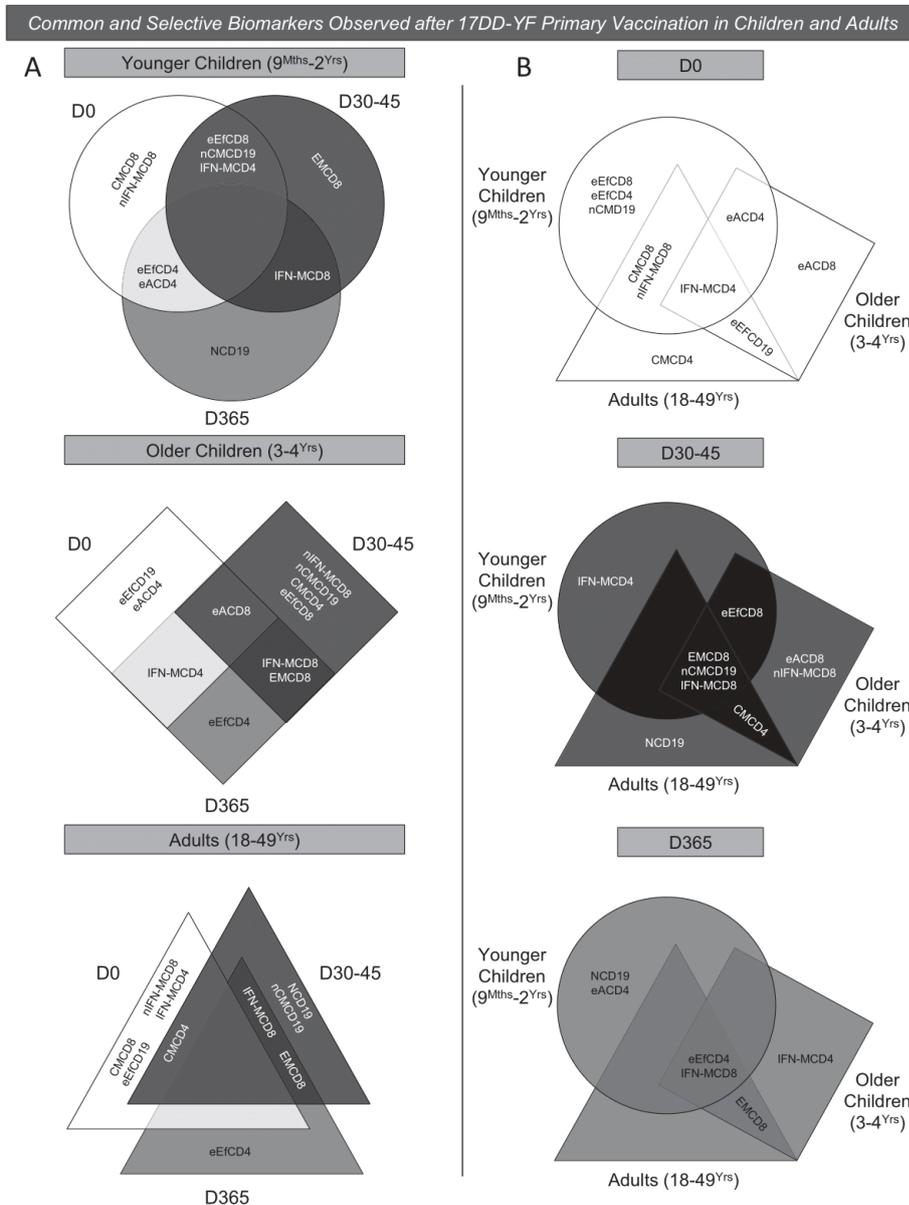


Fig. 8. Common and selective biomarkers observed after primary 17DD-YF vaccination in children and adults. Venn diagram analysis was employed to identify common and selective biomarkers amongst distinct time points (A) and age groups (B) upon primary 17DD-YF vaccination. Common and selective biomarkers observed at D0 ∩ D30-45 ∩ D365 for Younger Children (9^{Mths}-2^{Yrs})(○;●;⊙), Older Children (3-4^{Yrs})(□;■;⊞) and Adults (18-49^{Yrs})(△;▲;⊚) are displayed in the figure. Descriptive analysis of common and selective biomarkers observed for Younger Children (9^{Mths}-2^{Yrs}) ∩ Older Children (3-4^{Yrs}) ∩ Adults (18-49^{Yrs}) at distinct time points D0(○,□,△), D30-45(●,■,▲) and D365(⊙,⊞,⊚) are also provide in the figure.

of early planned vaccination boosters to guarantee the persistence of correlates of protection in children. We believe that differences in the immunological repertoire activated in younger children as compared to older children and adults may be associated with

the distinct duration of YF-specific response to 17DD-YF vaccine. Our hypothesis is that younger children elicited a broad but short-lived repertoire, while older children and adults mount a more selective immune response, inherent to a more restricted T

and B-cell repertoire observed along ageing, leading to a long-lasting protective immunity. Additional studies to support this hypothesis still remains to be performed.

Together our results demonstrated that regardless the similarities observed in neutralizing antibodies, age at primary vaccination impacts the duration of cellular response to primary 17DD-YF vaccination. Studies have previously demonstrated that YF-specific neutralizing antibodies, T and B-cell responses display a time-dependent decline following primary vaccination, especially in children [23,35,38,43]. The Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines has already demonstrated that the age at primary vaccination is an important variable that could impact on the seroconversion rate [20]. Rapid waning of immunity during the early years after vaccination has been reported upon vaccination of 9-month-old infants, which argues for a revision of the single-dose recommendation for this target population in endemic countries [34]. The short duration of humoral and cellular immunity observed in vaccinated subjects converges with previous studies and supports the current recommendation by the Brazilian Ministry of Health of a booster dose at 5 years of age. The inclusion of YF vaccine into the immunization program for children and adults living in areas without YFV circulation represents an important measure to anticipate protection, but the recommendation of regular booster dose should be considered to guarantee the effective control of YF expansion. In summary, the present study contributes to the understanding of the impact of pre-existing immunity to heterologous flavivirus (YFV, DENV and ZIKV) and age on the 17DD-YF vaccine-induced immune responses. The results presented here shed light on to the scientific knowledge about pre-existing immunity against flavivirus in vaccine efficacy and immunity. Our findings bring new insights that would be helpful to provide a comprehensive landscape of YF vaccine-induced immunity and of correlates of protection in areas without YF virus circulation.

Author contributions

Conception and Design of the study: LRR, ACCA, ESSS, ATC, OAMF

Funding Acquisition: CMD, MLSM, ATC, OAMF

Conducting experiments: LRR, IACR, ACCA, VPM, JGCR, CCP, DAO, LCF, SMBL, WDS, ASA

Field study: LABC, MLSM, ESSS

Acquisition of data: LRR, IACR, ACCA, VPM, JGCR, CCP, DAO, LCF, SMBL, ASA, WDS, APDAB, AMVS, AMBF, FBN, ATC

Analysis and interpretation of data: LRR, IACR, ACCA, LCF, SMBL, ASA, WDS, APDAB, AMVS, AFS, AMBF, FBN, OAMF

Statistical Support: TMC

Data Validation: LRR, ACCA, ATC

Coordination and Advisory committee: CLVF, AH, CMD

Drafting, Revising and final approval of the article: LRR, IACR, JGCR, ACCA, ATC, OAMF

Data availability

The results included in the present study are available from the corresponding author [LRR and OAMF] upon request.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was funded by Programa Nacional de Imunizações, Ministério da Saúde, Brazil, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). The study was carried out by students enrolled at the Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (FIOCRUZ-Minas) supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-RPT-FIOCRUZ for using the flow cytometry facilities. OAMF and ATC received PQ fellowships from CNPq and are research fellows from FAPEAM (PVN-II, PRÓ-ESTADO Program #005/2019).

References

- [1] WHO, Yellow fever Fact sheet: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>. Accessed on August 2nd, 2021.
- [2] Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. *J Clin Virol*. 2015 Mar;64:160-73. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>.
- [3] PAHO/WHO, Yellow Fever: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9476:yellow-fever&Itemid=40721&lang=en. Accessed on August 6th, 2021.
- [4] WHO, Eliminate Yellow fever Epidemics (EYE): a global strategy, 2017–2026. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255703>. Accessed on August 6th, 2021.
- [5] WHO, Vaccines and vaccination against yellow fever. WHO position paper – June 2013. *Weekly Epidemiological Record*. 2013; 88: 269–283.
- [6] CDC, Areas with Risk of Yellow fever Virus Transmission in Africa and South America. <https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/index.html>. Accessed on August 9th, 2021.
- [7] Dorigatti I, Hamlet A, Aguis R, Cattarino L, Cori A, Donnelly CA, et al. International risk of yellow fever spread from the ongoing outbreak in Brazil, December 2016 to May 2017. *Euro Surveill* 2017;22(28). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.28.30572>.
- [8] Barrett ADT. The reemergence of yellow fever. *Science* 2018 Aug 31;361(6405):847–8. <https://doi.org/10.1126/science.aau8225>.
- [9] Chen LH, Wilson ME. Yellow fever control: current epidemiology and vaccination strategies. *Trop Dis Travel Med Vaccines* 2020 Jan;10(6):1. <https://doi.org/10.1186/s40794-020-0101-0>.
- [10] BVS, Ministério da Saúde. <https://bvsms.saude.gov.br/em-2020-ministerio-da-saude-amplia-publico-para-vacinas-contra-febre-amarela-e-gripe/>. Accessed on August 6th, 2021.
- [11] Bifani AM, Ong EZ, de Alwis R. Vaccination and therapeutics: responding to the changing epidemiology of Yellow Fever. *Curr Treat Options Infect Dis* 2020;12(4):398–409. <https://doi.org/10.1007/s40506-020-00237-2>.
- [12] Jean K, Donnelly CA, Ferguson NM, Garske T. A meta-analysis of serological response associated with Yellow Fever Vaccination. *Am J Trop Med Hyg* 2016 Dec 7;95(6):1435–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0401>.
- [13] Muiyanga E, Ssemaganda A, Ngauv P, Cubas R, Perrin H, Srinivasan D, et al. Immune activation alters cellular and humoral responses to yellow fever 17D vaccine. *J Clin Invest* 2014;124(7):3147–58. <https://doi.org/10.1172/JCI75429>.
- [14] Camacho LAB, Freire Mds, Leal MdLF, Aguiar Sgd, Nascimento Jpd, Iguchi T, et al. Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Rev Saude Publica* 2004;38(5):671–8.
- [15] Hepburn MJ, Kortepeter MG, Pittman PR, Boudreau EF, Mangiafico JA, Buck PA, et al. Neutralizing antibody response to booster vaccination with the 17D yellow fever vaccine. *Vaccine* 2006;24(15):2843–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.12.055>.
- [16] Marchesani R, Thomas N, Monath TP, Shope RE, Schrader R, Nichols R, et al. Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (ARILVAX and YF-VAX) in a phase III multicenter, double-blind clinical trial. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(5):533–41. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.533>.
- [17] Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine. A randomised double-blind clinical trial of two yellow fever vaccines prepared with substrains 17DD and 17D–213/77 in children nine–23 months old. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015 Sep;110(6):771–80. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150176>.
- [18] Monath TP, Gershman M, Erin Staples J, Barrett ADT. Yellow fever vaccine. In: *Vaccines*. Elsevier Inc.; 2012. p. 870–968. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00043-4>.
- [19] Gotuzzo E, Yactayo S, Córdova E. Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. *Am J Trop Med Hyg* 2013 Sep;89(3):434–44. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0264>.
- [20] Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o estudo da soroconversão pela vacina contra febre amarela. Estudo multicêntrico de

- soroconversão pela vacina contra febre amarela. *Ciências de Saúde Coletiva*. 2003;8 (Suppl. 2):511.
- [21] Simões M. Otimização, padronização, validação e avaliação comparativa de testes de quantificação dos anticorpos neutralizantes para o vírus da Febre Amarela. Doctoral Thesis (Doctorate in Tropical Medicine) - Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro; 2018.
- [22] Denani CB, Vieira RO, et al. Improvement in throughput and accuracy of neutralization assay results by the automation of image acquisition and analysis. *Biomed J Sci Technical Res* 2020;25:00427. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2020.25.004271>. Published 2020 Feb 21.
- [23] Costa-Pereira C, Campi-Azevedo AC, Coelho-dos-Reis JG, Peruhype-Magalhães V, Araújo MSS, do Vale Antonelli LR, et al. Multi-parameter approach to evaluate the timing of memory status after 17DD-YF primary vaccination. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12(6):e0006462. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006462>.
- [24] Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Avelar RS, da Silveira Lemos D, et al. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *J Infect Dis* 2011;204(6):873–83. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir439>.
- [25] Shearer FM, Moyes CL, Pigott DM, Brady OJ, Marinho F, Deshpande A, et al. Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. *Lancet Infect Dis* 2017;17(11):1209–17. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30419-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30419-X).
- [26] Souza NCSE, Félix AC, de Paula AV, Levi JE, Pannuti CS, Romano CM. Evaluation of serological cross-reactivity between yellow fever and other flaviviruses. *Int J Infect Dis* 2019 Apr;81:4–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.023>.
- [27] Montoya M, Collins M, Dejnirattisai W, Katzelnick LC, Puerta-Guardo H, Jardi R, et al. Longitudinal analysis of antibody cross-neutralization following Zika Virus and Dengue Virus Infection in Asia and the Americas. *J Infect Dis*. 2018;218(4):536–45. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy164>.
- [28] Rey FA, Stiasny K, Vaney MC, Dellarole M, Heinz FX. The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO Rep* 2018;19(2):206–24. <https://doi.org/10.15252/embr.201745302>.
- [29] Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science* 2016;353(6301):823–6.
- [30] Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhães V, Coelho-dos-Reis JG, Antonelli LR, Costa-Pereira C, Speziali E, et al. Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine. 17DD Yellow Fever Revaccination and Heightened Long-Term Immunity in Populations of Disease-Endemic Areas, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2019;25(8):1511–21. <https://doi.org/10.3201/eid2508.181432>.
- [31] Grifoni A, Voic H, Dhandu SK, Kidd CK, Brien JD, Buus S, et al. T Cell Responses Induced by Attenuated Flavivirus Vaccination Are Specific and Show Limited Cross-Reactivity with Other Flavivirus Species. *J Virol* 2020;94(10). <https://doi.org/10.1128/JVI.00089-20>.
- [32] de Noronha TG, de Lourdes de Sousa Maia M, Geraldo Leite Ribeiro J, Campos Lemos JA, Maria Barbosa de Lima S, Martins-Filho OA, et al. Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine. Duration of post-vaccination humoral immunity against yellow fever in children. *Vaccine* 2019;37(48):7147–54. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.051>.
- [33] 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 Apr 20;25(16):3118–23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.053>.
- [34] Domingo C, Fraissinet J, Anshah PO, Kelly C, Bhat N, Sow SO, et al. Long-term immunity against yellow fever in children vaccinated during infancy: a longitudinal cohort study. *Lancet Infect Dis* 2019;19(12):1363–70. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30323-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30323-8).
- [35] Campi-Azevedo AC, Costa-Pereira C, Antonelli LR, Fonseca CT, Teixeira-Carvalho A, Villela-Rezende G, et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Hum Vaccin Immunother* 2016;12(2):491–502. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1082693>.
- [36] Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 2009;10(1):116–25. <https://doi.org/10.1038/ni.1688>.
- [37] 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 Oct;56(2):159–67. [https://doi.org/10.1002/jv.1096-9071\(199810\)56:2<159::aid-jmv10>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/jv.1096-9071(199810)56:2<159::aid-jmv10>3.0.co;2-b).
- [38] Collaborative group for studies on yellow fever vaccines. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine* 2014 Sep 3;32(39):4977–84. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.021>.
- [39] Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004;22(1):745–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>.
- [40] Butler NS, Nolz JC, Harty JT. Immunologic considerations for generating memory CD8 T cells through vaccination. *Cell Microbiol* 2011 Jul;13(7):925–33. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01594.x>.
- [41] Orenstein WA, Bernier RH, Hinman AR. Assessing vaccine efficacy in the field. Further observations. *Epidemiol Rev* 1988;10:212–41. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036023>.
- [42] Carsetti R, Tozzi AE. The role of memory B cells in immunity after vaccination. *Paediatrics Child Health* 2009;19(52):S160–2. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2009.08.012>.
- [43] Campi-Azevedo AC, Reis LR, Peruhype-Magalhães V, Coelho-dos-Reis JG, Antonelli LR, Fonseca CT, et al. Short-lived immunity after 17DD Yellow Fever single dose indicates that booster vaccination may be required to guarantee protective immunity in children. *Front Immunol* 2019 Sep;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02192>.