

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

KARINE VENEGAS MACIEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE miRNAs ASSOCIADOS A
RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV E
VACINADOS CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA**

Rio de Janeiro

2021

DISSERTAÇÃO MPCDI-INI

K.V. MACIEIRA

2021

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE miRNAs ASSOCIADOS A
RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV E
VACINADOS CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) para obtenção do grau de Mestre

ORIENTADORA: DRA. LARA ESTEVES COELHO

COORIENTADORA: DRA DALZIZA VICTALINA DE ALMEIDA

Rio de Janeiro

2021

KARINE VENEGAS MACIEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE miRNAs ASSOCIADOS A RESPOSTA
IMUNOLÓGICA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV E VACINADOS CONTRA O VÍRUS DA
FEBRE AMARELA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de
Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz
(Fiocruz) para obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Dra. Lara Esteves Coelho
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas- FIOCRUZ

Coorientadora: Dra. Dalziza Victalina de Almeida

Aprovada em: _____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Vanessa Salete de Paula
INSTITUTO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ

(Presidente)

Dra. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp
INSTITUTO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

Dr. Fernando Augusto Bozza
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - FIOCRUZ

Dra. Nathalia Beatriz Ramos de Sá
INSTITUTO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ

(Suplente)

Dedico este trabalho aos meus avôs Felipe e Pedro e as minhas avós Susi e Maria Lúcia. Sei que de onde quer que estiverem, estão muito orgulhosos!

Agradecimentos

Aos meus pais Jaqueline Venegas e Ricardo Macieira, por serem minha base, me incentivando sempre em todas as escolhas e me motivando a ir além. Sem o apoio, carinho e amor de vocês eu nada seria. Amo vocês!

A Dra. Dalziza, por acreditar mais uma vez em mim e me estimular a fazer o mestrado. Agradeço por estar comigo desde a Iniciação Científica me apoiando, me ensinando etapa por etapa, e permitindo que eu me desafiasse a cada dia. Obrigada por estar presente em todo o processo da minha formação, tornando-o mais leve apesar de todos os obstáculos que passamos.

A Dra. Lara Esteves por todo apoio, disponibilidade e auxílio. Obrigada por todo conhecimento passado, sempre de forma muito clara e gentil.

A Dra. Carmem Gripp por me acompanhar ao longo desses dois anos e meio e sempre com muito carinho e me ajudar com todo seu conhecimento imunológico.

Gostaria de agradecer imensamente a algumas pessoas que já trabalhavam comigo na rotina do laboratório, porém nesses últimos 2 anos e meio se mostraram verdadeiros amigos para todos os momentos. Andressa, Diogo e Nathália, durante esse período nós dividimos tantos momentos, histórias, risadas, choros, lanches, idas ao telhado no 26, conversas no WhatsApp até 3h da manhã, sustos e memes, né Diogo? Obrigada por sempre tirar o melhor de cada situação, seu olhar paciente e certo me acalmou e me fez pensar diferente em diversos momentos. Obrigada por toda ajuda e amizade sempre. Andressa, aprendo diariamente com você, mãe e mulher guerreira, colega exemplar e minha parceira na busca das células no nitrogênio! Nathália, a melhor risada que nós temos, aquela que repreende e abençoa todos nós e vive reclamando 24h por dia! Vocês sem dúvida fizeram a minha caminhada muito mais divertida, amo vocês!

Falando em amizade, não posso deixar de mencionar alguns presentes que ganhei nessa Pós-Graduação: Alejandra Galeano, Juliana Piedade, Karina Medeiros e Elizabeth Araújo. Tive muita sorte de poder dividir o primeiro ano com vocês. Juntos participamos de apresentações de seminários, trabalhos, provas, xerox, almoços sempre recheados de boas risadas. Vocês foram muito importantes e a prova disso foi a saudade que ficou na pandemia. Torço infinitamente para cada um de vocês!

Ainda no contexto da amizade, agradeço ao meu amor Caique Ferreira, que chegou durante a metade do mestrado. Obrigada por estar literalmente ao meu lado,

principalmente nesse período de pandemia e por me salvar com o “*procv*” e outras fórmulas do Excel acelerando algo que eu levaria horas para fazer. Obrigada pela sua companhia no computador ao lado, pelos chocolates e boa música sempre enquanto eu escrevia. Te amo!

Ao Dr. Marcelo por toda ajuda nas análises estatísticas.

A todos os membros do Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, eu aprendo diariamente com cada um de vocês!

A querida Verônica *Frozen* pelas conversas no quinto andar e pelo seu café quentinho que sempre vem em boa hora. Seu bom-humor e alegria são contagiantes.

A Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia por tantas disciplinas agregadoras e por sempre estarem presentes para os alunos. Agradeço em especial a Priscila por toda paciência e por nunca faltar quando precisávamos.

Ao Rodrigo Rezende da direção de Pesquisa Clínica do INI, por disponibilizar a verba necessária para compra de insumos e participação em cursos/congressos. Obrigada pela sua disponibilidade sempre!

A Plataforma de PCR em Tempo Real e ao Laboratório de Pesquisa em Malária pela disponibilidade e utilização do equipamento.

Aos órgãos de Fomento CAPES, CNPq e ao INI/Fiocruz pela concessão das bolsas de estudo e financiamento de pesquisa oferecidos durante o mestrado.

A todos os participantes do estudo, os meus sinceros agradecimentos.

MACIEIRA, K.V. (IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE miRNAs ASSOCIADOS A RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV E VACINADOS CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA). Mestrado (Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.) Rio de Janeiro, 2021. 99f.

RESUMO

Introdução: Entre os anos de 2016 e 2017 o Brasil passou por um surto de febre amarela, flavivirose transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* ou *Haemagogus*, levando a ampliação da cobertura vacinal no país. A vacina contra Febre Amarela (17DD) é uma vacina de vírus vivo que tem sua administração contra-indicada em indivíduos portadores de doenças imunocomprometedoras. No contexto de indivíduos vivendo com HIV, a vacina é contra-indicada em casos de imunodeficiência grave ($CD4 < 200$ cels/mm³), pois, resulta em uma resposta de fase aguda, levando ao aumento dos níveis de citocinas envolvidas no balanço da resposta imunológica pró-inflamatória. Os miRNAs regulam várias funções imunológicas e demonstram ser biomarcadores de ativação de linfócitos e importantes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, refletindo seu papel importante na resposta imune e na atividade de anticorpos neutralizantes pós vacinação. O presente estudo teve como objetivo, caracterizar a expressão de miRNAs em relação a expressão de citocinas em indivíduos vivendo com HIV-1 vacinados contra a febre amarela. **Métodos:** Incluímos neste estudo (aprovado pelo CEP), 70 indivíduos (50 PVHIV e 20 controles negativos) que assinaram o TCLE e receberam vacina contra febre amarela. As amostras de sangue foram coletadas na pré-vacinação, no 5º após vacinação e utilizadas para separação das PBMC seguida da obtenção do RNA. O cDNA foi sintetizado para as análises de expressão gênica das citocinas (IL-6, IL-10, IL-21, TGF- β), receptores (CD19 e CD163) e miRNAs (mir-21, mir-146, mir-155 e mir-520). Para as análises da quantificação relativa, utilizamos a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que representa quantas vezes o gene alvo está mais expresso em relação ao controle. Nas análises estatísticas, utilizamos o teste t *Mann Whitney* e *Kruskal-Wallis*. As amostras de sangue também foram coletadas no dia 30 para análises de citometria e PRNT (resultados de colaboração). **Resultados:** Tanto os indivíduos PVHIV quanto o grupo controle, demonstram uma queda acentuada de linfócitos TCD4⁺ no quinto dia após aplicação da vacina, mas esse declínio não impactou na produção de anticorpos neutralizantes no dia 30. A expressão relativa do receptor CD163 antes da vacinação apresentou menor expressão em PVHIV. A expressão da citocina IL-10 apresentou um *fold change* (mediana de 1,4 vezes mais expressa) maior nos participantes do grupo PVHIV após a vacinação. Os alvos CD19 e TGF- β demonstram uma tendência de queda na expressão diferencial em PVHIV e grupo controle. Os mir-21, mir-146 e mir-155 não apresentaram diferença estatística na sua expressão entre PVHIV e o grupo controle. O mir-520 só apresentou detecção da expressão gênica para seis indivíduos, tornando inviável as análises de expressão diferencial desse alvo. **Conclusão:** A vacina foi imunogênica e os indivíduos mostraram títulos neutralizantes protetores um mês após a vacinação. Não foi possível determinar biomarcadores baseados na expressão dos miRNAs relacionados aos alvos pois os achados não sugerem correlação entre a expressão diferencial das citocinas e dos possíveis miRNAs. Acreditamos que a IL10 seja altamente expressa em PVHIV para limitar a resposta imune inata ativada pelo HIV-1, reduzindo o dano tecidual e a inflamação excessiva promovida pela vacina atenuada 17DD.

Palavras-chave: citocinas, miRNAs, vacina, biomarcadores, HIV/AIDS

MACIEIRA, K.V. (IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE miRNAs ASSOCIADOS A RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV E VACINADOS CONTRA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA). Mestrado (Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.) Rio de Janeiro, 2021. 99f.

ABSTRACT

Introduction: Between 2016 and 2017, Brazil experienced a problem with yellow fever, a flavivirus transmitted by mosquitoes of the *Aedes* or *Haemagogus* genus, leading to an expansion of vaccination coverage in the country. Vaccine against Yellow Fever (17DD) is a live virus vaccine that is contraindicated in patients with immunocompromising diseases. In the context of people living with HIV, the vaccine is counter-selected in cases of severe immunodeficiency (CD4 <200 cells/mm³), leading to increased levels of cytokines involved in the balance of the response pro-inflammatory immune response. miRNAs regulate several immune functions and are shown to be biomarkers of lymphocyte activation and important post-transcriptional regulators of gene expression, reflecting their important role in the response and in the activity of neutralizing agents after vaccination. The present study aimed to characterize the expression of miRNAs in relation to the expression of cytokines in people living with HIV-1 vaccinated against yellow fever. **Methods:** We included in this study, 70 requests (50 PLHIV and 20 controls) who signed the consent form and received vaccine against yellow fever. Blood samples were collected in the pre-vaccination, on the 5th day after vaccination and used to separate the PBMC followed by the RNA display. The cDNA was synthesized for the analysis of gene expression of cytokines (IL-6, IL-10, IL-21, TGF- β), receptors (CD19 and CD163) and miRNAs (mir-21, mir-146, mir-155 and mir-520). For the relative quantification, we used the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ that represents several times the target gene is more expressed in relation to the control. In the statistical analyses, we used the Mann Whitney and Kruskal-Wallis test. Blood was also collected on day 30 for cytometric and PRNT analysis (collaborative results). **Results:** Both PLHIV and the control group demonstrate a marked drop in TCD4⁺ lymphocytes on the fifth day after vaccine application, but this decline did not impact neutralizing production on day 30. CD163 receptor expression before vaccination and lower expression in PLHIV. The expression of the cytokine IL-10 showed a higher fold change (median 1.4 times more expressed) in the participants of the PLHIV group after vaccination. CD19 and TGF- β targets demonstrate a downward trend in differential expression in PLHIV and in the control group. Mir-21, mir-146 and mir-155 did not differentiate statistically in expression between PLHIV and the control group. Mir-520 only detects gene expression for six, making differential expression analysis of this target unfeasible. **Conclusion:** The vaccine was immunogenic and neutralizing titers protective one month after vaccination. We observed that the vaccine induced the expression of IL-10 in PLHIV and induced a drop in expression of CD19 and TGF- β in both groups. It was not possible to determine the expression of biomarkers based on the expression of target-related miRNAs and the findings do not show a correlation between the differential expression of cytokines and possible miRNAs. We believe that IL-10 is highly expressed in PLHIV should limit the innate immune response activated by HIV-1, reducing tissue damage and excessive inflammation promoted by the attenuated 17DD vaccine.

Keywords: cytokines, miRNAs, vaccine, biomarkers

Lista de Figuras

Figura 1: Vírus da febre amarela e sua representação esquemática.....	16
Figura 2: Estrutura genômica do vírus da Febre Amarela.....	16
Figura 3: Os ciclos de transmissão da Febre Amarela.....	17
Figura 4: Rota do vírus da Febre Amarela no hospedeiro.....	19
Figura 5: Série histórica do número de casos humanos confirmados de Febre Amarela e letalidade de acordo com o ano de início dos sintomas.....	20
Figura 6: Representação esquemática da estrutura do HIV-1.....	23
Figura 7: Estimativas de número de pessoas vivendo com HIV-1, novas infecções e mortes relacionadas à aids no mundo e de acordo com as diferentes regiões.....	25
Figura 8: Expressão da interleucina-10 no sistema imunológico.....	33
Figura 9: Biogênese, processamento e maturação de miRNAs.....	36
Figura 10: miRNAs na diferenciação de células do sistema imunológica.....	38
Figura 11: Contagem de células T CD4 ⁺ /mm ³ dos participantes em D0 e D5.....	53
Figura 12: Análise de Correlação de Pearson entre o declínio de CD4 ⁺ na visita de dia 5 e na visita de dia 30.....	54
Figura 13: Títulos Neutralizantes no dia 30 para o grupo de participantes com aumento, declínio ou estabilização de células CD4 ⁺ no d5, pós-vacinação anti-Febre Amarela.....	55
Figura 14: Análise de integridade do RNA total.....	56
Figura 15: Limite de detecção do pool em cada alvo a partir de uma diluição seriada partindo de 2,5 ug a 16 ng.....	57
Figura 16: Valores de CTs dos genes endógenos da β -actina e do GAPDH.....	58
Figura 17: Valores de expressão relativa antes da vacinação contra Febre Amarela.....	59
Figura 18: Valores de expressão relativa depois da vacinação contra febre amarela.....	59
Figura 19: Mapa de calor do fold change das citocinas e receptores.....	60
Figura 20: Gráficos da Quantificação Relativa (log ₁₀) das amostras dos 70 indivíduos após a vacinação contra a Febre Amarela.....	63
Figura 11 Valores de CTs do gene endógeno mir-26a.....	65
Figura 22: Mapa de calor do Fold Change dos miRNAs.....	66
Figura 23: Gráfico da Quantificação Relativa (log ₁₀) das amostras dos 48 indivíduos após a vacinação contra a Febre Amarela.....	68
Figura 24: Gráfico com o Δ CT das amostras dos 48 indivíduos após a vacinação contra a Febre Amarela.....	69
Figura 25: Análise de Correlação de Pearson entre os valores de fold change dos miRNAs avaliados e dos respectivos alvos.....	71
Figura suplementar 1.....	99

Lista de Tabelas

Tabela 1: Procedimentos clínicos realizados com os participantes do estudo, por visita.	43
Tabela 2: Genes endógenos humanos utilizados para a análise da expressão gênica	46
Tabela 3: Genes codificadores para citocinas humanas utilizadas na análise da expressão gênica.....	47
Tabela 4: Ciclagem utilizada para os ensaios TaqMan Advanced miRNA Assays	49
Tabela 5: Gene endógeno utilizado para a análise da expressão gênica.	49
Tabela 6: Genes codificadores para citocinas humanas utilizadas na análise da expressão gênica.....	50
Tabela 7: Dados sócio-demográficos dos participantes do estudo.....	52
Tabela 8: Média geométrica dos valores de fold change de cada alvo.....	64
Tabela 9: Média geométrica dos valores de fold change de cada alvo.....	69
Tabela Suplementar 1.....	98
Tabela Suplementar 2.....	98
Tabela Suplementar 3.....	99

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ALT: alanina aminotransferase
AST: aspartato aminotransferase
Bregs - células B reguladoras
cDNA - DNA complementar
CD19 – Marcador de superfície celular de linfócitos B
DCs - células dendríticas
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DsRNA- RNA dupla fita
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FA – Febre Amarela
Gapdh- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gp41- Glicoproteína 41
Gp120- Glicoproteína 120
IFN- γ – Interferon gamma
Ig – Imunoglobulina
IL- Interleucina
LAMP-1- Proteína de membrana lisossomal-1
MGT: média geométrica de título
mRNA – RNA mensageiro
miRNA- MicroRNA
ncRNA- RNA não codificante
NK – Natural Killer
HIVneg – Não infectados pelo HIV
PBMC – Células mononucleares do sangue periférico
PBS – Tampão Fosfato Salínico
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
pre-miRNA – precursor de microRNA
pri-miRNA – microRNA primário
PRNT: neutralização por redução de placas de Lise
PVHIV – Pessoas Vivendo com HIV
qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
RNA- Ácido ribonucleico
RIN – número de integridade do RNA

ROC - relative operating characteristics curve

RISC- complexo silenciador induzido por RNA

TARV - Terapia Antirretroviral

TGF- β – Fator de Crescimento Tumoral Beta

Th1 – Células TCD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2 – Células TCD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

μ g - Micrograma

μ L - Microlitro

UNAIDS - Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS

YFV-17D- Vírus da febre amarela cepa 17D

Sumário

1. Introdução	
1. Febre amarela	15
1.1. O vírus da Imunodeficiência Humana	21
1.2. Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1	22
1.3. Vacina da Febre Amarela em Pessoas Vivendo com HIV	27
1.4. Modulação imunológica da vacina contra a febre amarela	29
1.5. Inflamação e influência das citocinas	31
1.6. Regulação Pós-transcricional por miRNA	34
1.7. Justificativa	40
2. Objetivo Geral	41
2.1. Objetivos específicos	41
3. Materiais e Métodos	41
3.1 Desenho do estudo	41
3.2 Casuística e critérios de inclusão no estudo	42
3.3 Visitas do estudo	42
3.4 Obtenção e contagem de células mononucleares do sangue periférico	43
3.5 Ensaio de Neutralização por anticorpos	43
3.6 Citometria de Fluxo	44
3.7 Citocinas e Receptores	44
3.7.1 Extração de RNA Total	44
3.7.2 Reação de Transcriptase Reversa	45
3.7.3 Expressão Gênica através da PCR quantitativa (qPCR)	45
3.8 microRNAs	47
3.8.1 Extração de miRNA	47
3.8.2 Reação de Transcriptase Reversa	48
3.8.3 Expressão Gênica através da PCR quantitativa (qPCR)	48
3.9 Análises dos dados	50
4. Resultados	52
4.1 População de Estudo	52
4.2 Contagens de Linfócitos TCD4 ⁺ dos indivíduos do estudo	52
4.3 Padronização da Técnica de Extração de RNA	56
4.4 Padronização da reação de PCR em Tempo Real	57
4.5 Estabilidade de expressão dos genes endógenos das citocinas	58
4.6 Comparação da expressão relativa das citocinas e receptores antes e depois da vacina	58
4.7 Expressão diferencial das citocinas e receptores	60
4.8 Avaliação da expressão diferencial das citocinas e receptores	61
4.9 Estabilidade de expressão do gene endógeno mir-26 ^a	62
4.10 Expressão diferencial dos miRNAs	64
4.11 Correlação entre a expressão dos miRNAs com as citocinas e receptores	70
5. Discussão	72
6. Conclusões	82
7. Perspectivas	83
8. Considerações Finais	83
9. Referências	84
10. Apêndice	98

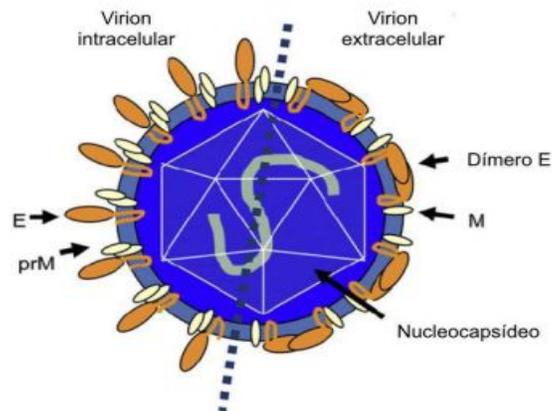
INTRODUÇÃO

1. FEBRE AMARELA

A febre amarela é uma doença infecciosa febril aguda transmitida por vetores artrópodes e causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, sendo endêmica na América do Sul e na África Subsaariana (WESTAWAY EG *et al*, 1985). 1. O vírus foi descrito primeiramente nas regiões do centro e leste africanos, e acredita-se que devido às intensas rotas comerciais dos séculos XVI e XVII, chegou até a América do Sul (LEPINEIC *et al*, 1994; CHANG *et al*, 1995; BARRETT & HIGGS, 2007).

O vírus da Febre Amarela, pertence à família *Flaviviridae*, que inclui aproximadamente 70 espécies de vírus (WESTAWAY *et al.*, 1985). São vírus esféricos, envelopados, com projeções na superfície, medindo de 40-60 nm de diâmetro, como representado na figura 1 (MONATH, 2001). Possuem em sua composição RNA de fita simples não segmentado (STAPLES; MONATH, 2008), e apresentam apenas um subtipo com variações genéticas na América do Sul e África (STAPLES; MONATH, 2008). O genoma do vírus é composto de 10.862 nucleotídeos, que codificam 3.411 aminoácidos, e apresenta uma única região codificante, responsável pela formação das proteínas virais. Duas regiões não-codificantes são também encontradas e embora não contribuam com formação de proteínas, têm o seu papel na regulação e expressão viral, como replicação, virulência e patogenicidade (MONATH, 2001). São dez os genes existentes presentes no genoma do vírus, dos quais três codificam proteínas estruturais e sete proteínas não-estruturais. Observamos na figura 1, a estrutura do vírus e suas as proteínas estruturais E (envelope), M (membrana) e C (capsídeo) (DUARTE DOS SANTOS *et al.*, 1995).

Figura 1: Vírus da febre amarela e sua representação esquemática.

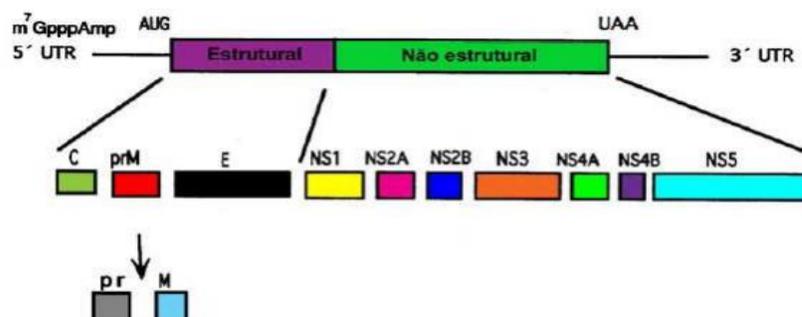


Fonte: Adaptado de Gardner (2010). Na figura, observamos as três proteínas estruturais do vírus: as proteínas M, E e C que codificam o precursor da proteína de membrana (M), do envelope (E) e do capsídeo.

Durante o ciclo replicativo, as proteínas estruturais são incorporadas nos vírions maduros e liberadas no meio extracelular, enquanto as proteínas não estruturais ficam retidas na membrana das células infectadas (MONATH, 2001). A glicoproteína E, é o maior componente do envelope do vírus, e corresponde pelos eventos iniciais de infecção além se der o principal alvo de resposta imunológica do hospedeiro (MONATH, 2001). Apesar das poucas variações nos pares de bases (9%), sete genótipos distintos do vírus podem ser encontrados, sendo que cinco deles ocorrem no continente africano e dois na América do Sul (RICE et al, 1985).

As proteínas não estruturais são compostas por: NS1, NS3 e NS5 (altamente conservadas) e NS2A, NS2B, NS4A e NS4B (pequenas proteínas), todas apresentadas na figura 2 (CHAMBERS; MCCOURT; RICE, 1989).

Figura 2: Estrutura do genoma do vírus da febre amarela.



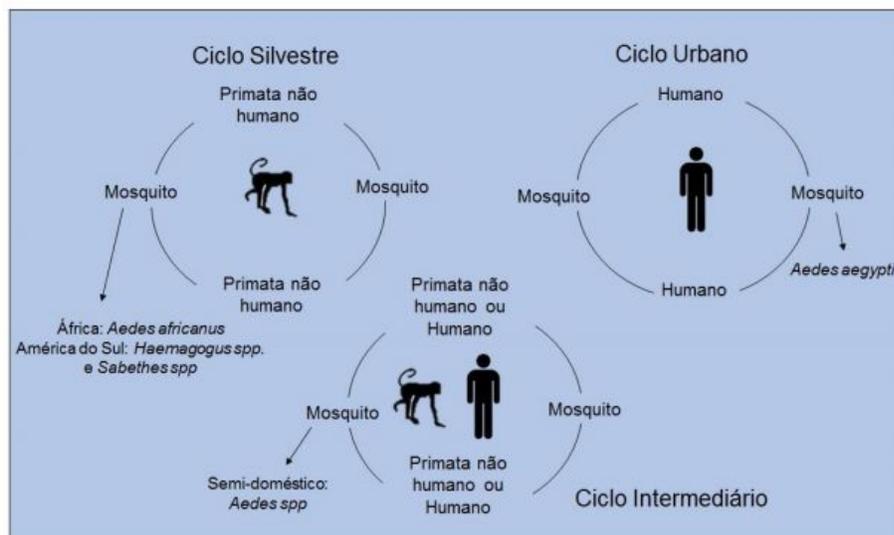
Fonte: Machado, 2007.

Possui: genes estruturais, não estruturais, regiões não traduzidas 5' NTR e 3' NTR e a formação das proteínas virais após o processamento proteolítico.

O vírus da febre amarela possui uma quantidade de hospedeiros relativamente restrita para a infecção produtiva (produção de progênie viral infecciosa, acompanhada de patologia ou morte celular), sendo assim mantido na natureza através da transmissão entre primatas não-humanos e mosquitos hematófagos pertencentes principalmente aos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, caracterizando o ciclo da Febre Amarela Silvestre (ABREU et al., 2019; TESH et al., 2001). Neste ciclo, hospedeiros humanos são infectados ocasionalmente quando picados por mosquitos silvestres que previamente ingeriram sangue de um primata virêmico.

No ciclo urbano, o vírus é transmitido de homem a homem pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti*, infectada pelo vírus da febre amarela. Neste ciclo, não ocorre participação de animais silvestres e o homem é o único hospedeiro responsável pela infecção do mosquito (GUBLER; KUNO; MARHOFF, 2007; MONATH; VASCONCELOS, 2015b). Na África, um ciclo intermediário ocorre nas savanas, abrangendo a transmissão do vírus por mosquitos do gênero *Aedes* que ocupam áreas peridomiciliares, e atinge a população humana que reside ou trabalha em locais ao redor de florestas. Neste ciclo, o vírus pode ser transmitido de macacos para humanos ou entre humanos, como demonstrado na figura 3 (GERSHMAN; STAPLES, 2011).

Figura 3: Os ciclos de transmissão da Febre Amarela



Fonte: Shayenne Olsson Freitas Silva; 2018. **Ciclo Silvestre:** envolve a transmissão do vírus através mosquito para primatas não humanos e destes primatas para os mosquitos vetores. **Ciclo Urbano:** o mosquito transmite o agente etiológico para os humanos e os mesmos infectados podem transmiti-lo para mosquitos. **Ciclo Intermediário:** transmissão do agente etiológico tanto de mosquitos para humanos quanto de mosquitos para primatas não humanos e destes para os mosquitos.

O período de incubação do vírus da febre amarela é de 3 a 6 dias e a maioria dos indivíduos se mantêm assintomáticos após a picada do mosquito infectante (VASCONCELOS, 2002). O período de transmissibilidade começa um dia antes do início dos sintomas e vai até o terceiro ou quarto dia de doença, o que corresponde ao período de viremia. O quadro clínico da febre amarela pode variar de uma infecção subclínica à doença sistêmica, essa diferença está principalmente relacionada com as cepas virais e com fatores imunológicos do hospedeiro, que ainda não são completamente compreendidos (BARNETT, 2007).

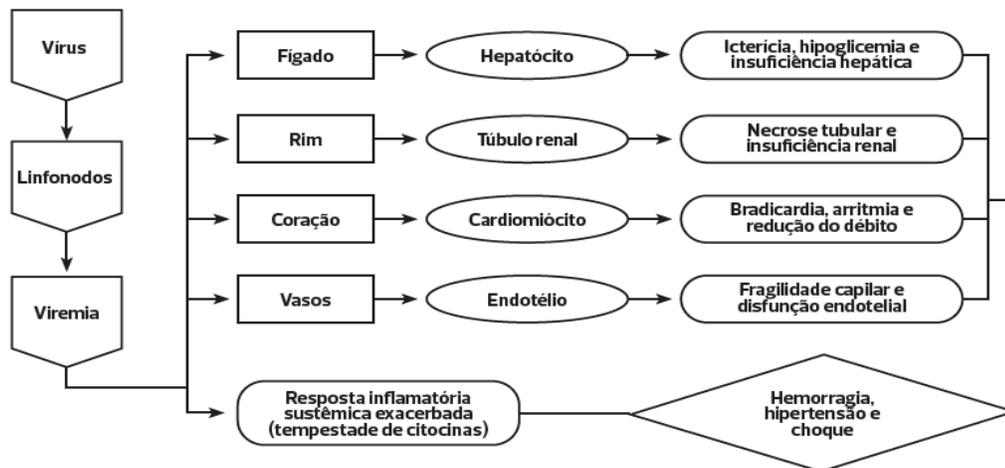
A febre amarela é uma doença caracterizada na maioria das vezes por surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto para saúde pública. Na fase inicial da infecção, é marcada por sintomas inespecíficos como náuseas, febre alta, cefaleia intensa, dores musculares e vômitos, que correspondem com o período de viremia nas formas leves e moderadas, as quais representam 90% dos casos (VASCONCELOS, 2002). Os indivíduos que desenvolvem as formas graves, responsáveis por quase todas as internações e óbitos, apresentam quadro clínico semelhante às outras formas da doença com agravamento dos sintomas, podendo levar a insuficiência renal e hepática (MONATH, 1995; QUARESMA, 2003). Nos pacientes que evoluem para forma grave, a taxa de letalidade varia entre 25 a 50% dos participantes (VASCONCELOS; 2000).

Na infecção em humanos, após a picada do vetor e introdução do vírus na circulação do indivíduo suscetível, em poucas horas os linfonodos regionais são atingidos e o vírus desaparece da circulação nas 24 horas seguintes. Nos linfonodos, o vírus infecta preferencialmente macrófagos e linfócitos, realizando assim, seu ciclo replicativo seguido da posterior liberação das partículas virais pelas células. Estas, são levadas através dos vasos linfáticos até a corrente sanguínea iniciando o período de viremia, atingindo o fígado (principal órgão acometido) juntamente com coração, rins e tecidos linfoides (MONATH, 2001). Em nível macroscópico, a pele fica icterícia, podendo existir múltiplas hemorragias ou petéquias, o coração fica amolecido e friável, os rins ficam edemaciados e com uma coloração rosa-acinzentada. Algumas vezes observam-se pequenos derrames peritoneais e pleurais (ROBERT, E. SHOPE; 1986). No fígado, as células de Küpffer e os hepatócitos são infectados, apresentando um aumento em seu volume, e coloração amarelada, com hemorragias subcapsulares (KLOTZ & BELT, 1930a). No fígado pode ocorrer diversas alterações histológicas como, esteatose e a necrose dos hepatócitos. As lesões médio-zonais podem ser

estudadas por diversos fatores que incluem desde efeitos citopáticos virais diretos nas células hepáticas a respostas celulares através de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e macrófagos (QUARESMA, 2006).

Disfunções orgânicas como a insuficiência hepática, estão associadas a uma exacerbada resposta inflamatória sistêmica com liberação de uma gama de substâncias pró-inflamatórias e citocinas como: fator de necrose tumoral (*tumor necrosis fator*, TNF), interleucina (IL)-1 IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 e IL-16. Essa “tempestade de citocinas” desencadeia uma série de eventos como lesões endoteliais, distúrbios de coagulação, aumento da permeabilidade capilar e extravasamento plasmático, tornando-se a principal causa da hipotensão e choque hemodinâmico da forma grave da doença. Essas alterações, somadas as disfunções cardíaca, renal, e principalmente hepática, acabam levando a falência de múltiplos órgãos, como descrito na figura 4 (MONATH; BARRETT, 2003).

Figura 4: Rota do vírus da Febre Amarela no hospedeiro

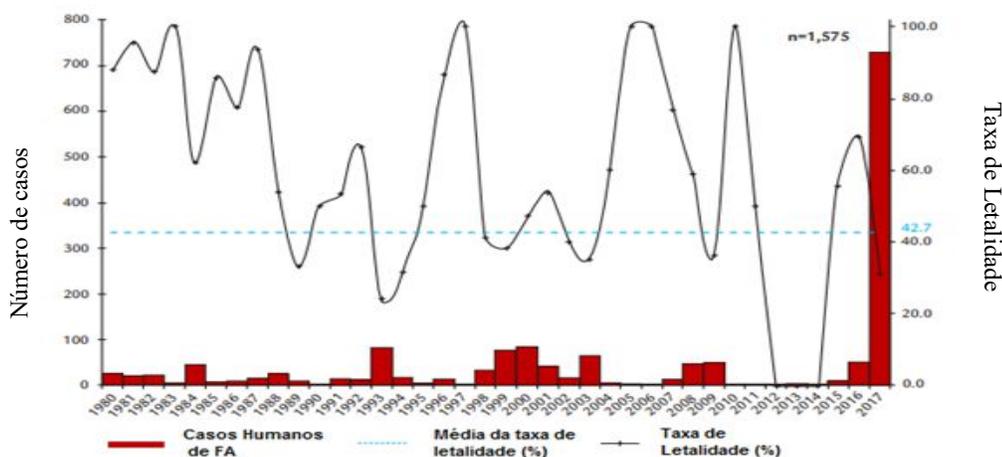


Fonte: Adaptado de Monath e Barrett, 2003. A partir da inoculação do vírus pelo inseto vetor, ocorre comprometimento dos linfonodos e disseminação hematogênica, acarretando a hemorragia, hipertensão e choque. Fonte:

O período da viremia pode alterar conforme a apresentação clínica, podendo levar de algumas horas até dois dias nas formas brandas, e de até cinco a sete dias nas formas mais graves (MONATH, 2001). Este período coincide com o início do período da enfermidade, em particular com a febre, representando a fase em que o sangue humano torna-se infeccioso para os vetores não infectados (MONATH, 2001).

O Brasil viveu entre 2016/2017 o maior surto de febre amarela observado há décadas, envolvendo principalmente estados da região Sudeste, em particular Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo (SINAN; 2017). Ainda que o número de casos humanos de febre amarela confirmados seja maior que o verificado em surtos anteriores, destaca-se que esses casos são de residentes em zonas rurais ou que entraram em contato com áreas silvestres por motivos de trabalho ou de lazer (MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2017). Na figura 5, é possível observar o número de casos humanos confirmados para febre amarela e a sua taxa de letalidade no Brasil, de 1980 até 2017.

Figura 5: Série histórica do número de casos humanos confirmados de Febre Amarela e letalidade de acordo com o ano de início dos sintomas no Brasil, de 1980 a junho de 2017.



Fonte: Sinan; GT-Arbo / UVTV / CGDT / DEVIT / SVS / MS.

Em relação ao monitoramento da situação epidemiológica da Febre Amarela no Brasil, entre o período de 01/07/2018 a 30/06/2019, com última atualização em 01/02/2020, foram notificados 755 casos em humanos. Destes, 15 foram confirmados, seis foram a óbito, 641 casos foram descartados e 99 estavam em investigação (“Informe nº 10 | 2017/2018”, Ministério da Saúde). Por não existir um tratamento específico para a Febre Amarela, os participantes sintomáticos recebem somente cuidados de suporte. Apesar dos recentes casos, a vigilância epidemiológica é bem estruturada, contando com o apoio dos Sistemas de Informações em Saúde (SIS/DATASUS), SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), onde

todos os casos suspeitos devem ser notificados antes mesmo dos resultados laboratoriais, pois se trata de uma doença de notificação compulsória e imediata.

O diagnóstico completo da febre amarela pode ser realizado utilizando métodos virológicos como: isolamento do vírus em cultura de células (BEATY B, CALISHER CH, SHOPE RE; 1989), identificação de antígenos virais (HALL et al., 1991) e do RNA viral (LANCIOTTI et al., 1992), e métodos sorológicos (dosagem de anticorpos específicos pelo método de IgM-ELISA, através da captura de anticorpos IgM em ensaio enzimático) (KUNO; GÓMEZ; GUBLER, 1987), ou conversão sorológica em testes de inibição da hemaglutinação (BEATY B, CALISHER CH, SHOPE RE; 1989). Os métodos sorológicos que identificam IgM específico, como é o caso do IgM-ELISA, podem fornecer o diagnóstico presuntivo rápido em uma amostra sorológica, se a mesma for obtida a partir do 5º dia de doença. Vale ressaltar que a vacina contra Febre Amarela também induz a formação de IgM e, por isso, importa conhecer os antecedentes vacinais do caso suspeito (MONATH; VASCONCELOS, 2015a).

1.1. O vírus da Imunodeficiência Humana

O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), é o agente etiológico causador da síndrome da imunodeficiência adquirida, conhecida como aids. Essa doença foi inicialmente diagnosticada em 1981 e a identificação do agente etiológico foi caracterizada em 1983, por BARRÉ-SINOUSI e em 1984 por Robert Gallo (POPOVIC et al., 1984). Apesar de décadas de intensa pesquisa na busca de uma vacina e da cura para a aids, avanços significativos foram observados de fato, na prevenção e no tratamento. A principal razão para a persistência do HIV/aids é a dificuldade em erradicar os múltiplos reservatórios virais que existem no corpo do hospedeiro. Outro fator importante que dificulta a erradicação viral é a alta complexidade replicativa deste vírus que produz novas partículas virais distintas a cada ciclo replicativo que burlam o sistema imunológica (BERGANTZ et al., 2019).

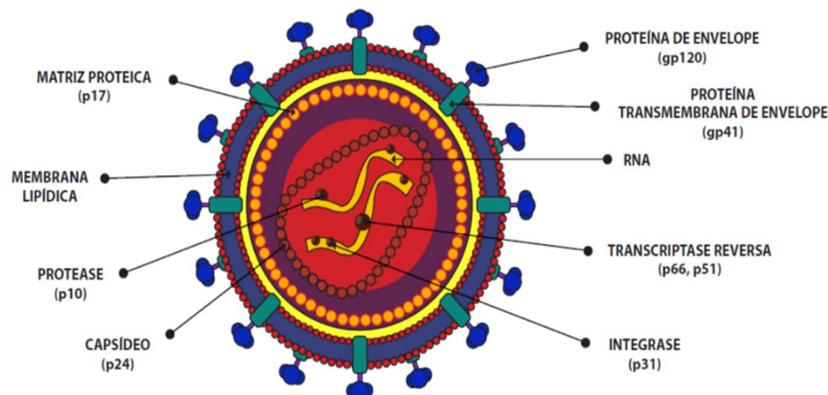
O genoma do HIV-1 é composto por nove regiões gênicas: três genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), comuns a todos os retrovírus, e responsáveis por codificarem proteínas que vão compor a estrutura viral; dois genes reguladores (*tat* e *rev*); e, quatro acessórios (*vif*, *vpr*, *nef* e *vpu* – no caso do HIV-1 - ou *vpx* – no caso do HIV tipo-2, o HIV-2). Na extremidade 3' e 5' do genoma do HIV-1 são encontradas repetições terminais longas (LTRs - do inglês, *long terminal repeats*), onde estão

localizadas as principais sequências promotoras para a transcrição dos genes virais, sendo importantes também na transcrição reversa e integração viral ao genoma do hospedeiro (PERERLIN & TRONO, 2003; SHAH et al., 2014).

O HIV-1 pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus*. A origem do HIV-1 se deu a partir de múltiplas transmissões zoonóticas do vírus da imunodeficiência símia (SIV) de primatas não humanos para humanos, no centro-oeste da África. Esses eventos de transmissões independentes geraram o HIV-1 e seus respectivos grupos conhecidos: M, N, O e P; bem como o HIV-2 e seus grupos A-H (GAO et al., 1999). Tanto o HIV-1 quanto o HIV-2 são oriundos de diferentes eventos de introdução na população humana (HAHN et al., 2000). Os grupos M e N do HIV-1 apresentam relação filogenética com o SIVcpz, que infecta chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*), e os grupos O e P com o SIVgor, que infecta gorilas (*Gorilla gorilla*), enquanto o HIV-2 apresenta relação com o SIVsm, que infecta macacos da espécie *Sooty mangabey* (D'ARC et al., 2015).

A partícula viral do HIV possui uma forma esférica com cerca de 100 nm de diâmetro, é citopático, não oncogênico, sendo envolvido externamente por uma membrana lipoglicoprotéica denominada envelope viral. Na região externa da membrana estão contidas as glicoproteínas de superfície, gp120 e transmembrana, gp41, que são derivadas da proteína precursora gp160 e estão envolvidas na etapa de entrada do vírus na célula alvo (revisto por GROSSMAN et al., 2002; BLUMENTHAL et al., 2012). Na região interna, o vírus possui uma matriz proteica constituída pela proteína p17, e o capsídeo viral formado pela proteína p24 (PLANTIER et al., 2009). No interior do capsídeo encontra-se o genoma viral constituído de duas fitas simples de RNA similares (ácido ribonucleico), com polaridade positiva, associadas a proteínas do nucleocapsídeo (p7) e a três enzimas virais, chamadas transcriptase reversa (TR; p51), integrase (IN; p31) e protease (PR; p11) (BARRE-SINOUSI et al., 1996) (Figura 6).

Figura 6: Representação esquemática da estrutura do HIV-1.



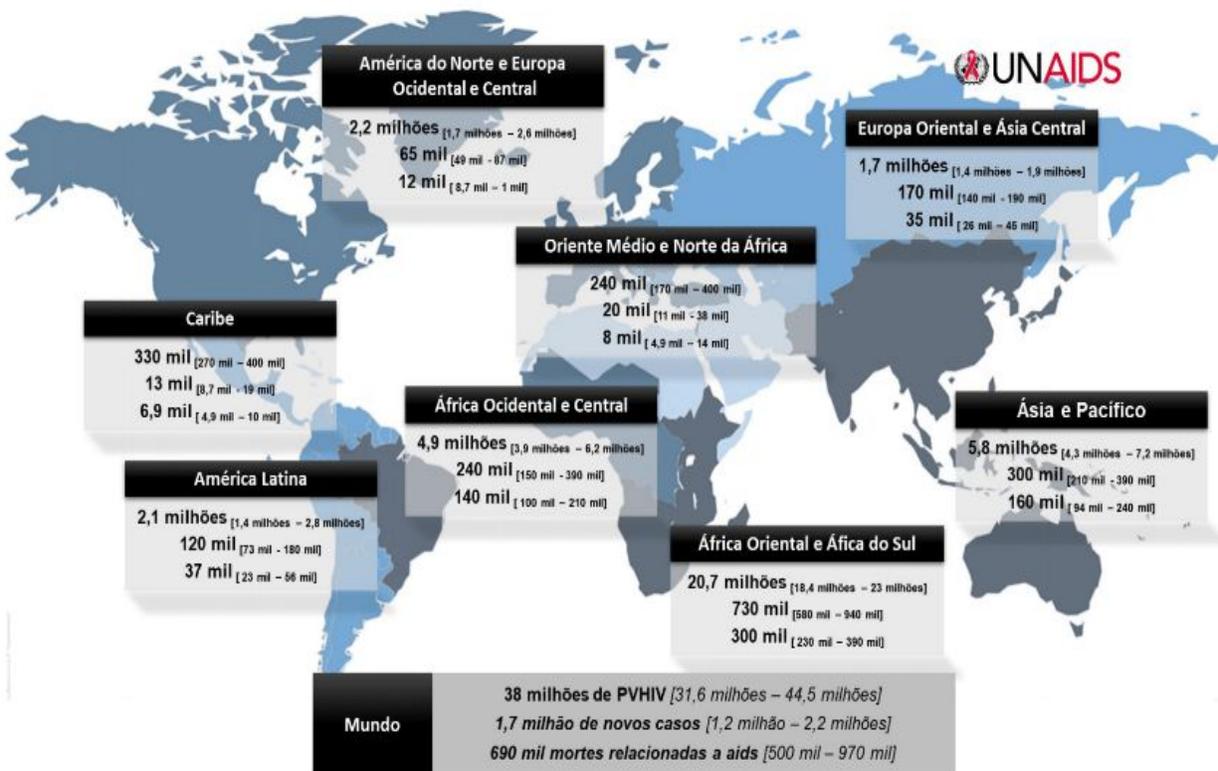
Fonte: Ministério da Saúde, 2014.

A infecção pelo HIV-1 é iniciada a partir da entrada do vírus nas células alvo do hospedeiro, que expressam a molécula $CD4^+$, tais como linfócitos $TCD4^+$, células dendríticas e macrófagos, e correceptores da família das quimiocinas α e β , principalmente o CCR5 e CXCR4 (FERGUNSON et al., 2002; RAD et al., 2018). O ciclo de replicação do HIV-1 inicia-se pela interação entre a glicoproteína viral gp120 com o receptor $CD4^+$ do hospedeiro, gerando mudanças conformacionais na estrutura da proteína gp120, expondo novos epítomos que permitem a interação com o correceptor. Nesse processo, outra glicoproteína do envelope viral é exposta, a gp41, permitindo assim, a ligação da gp120 com o correceptor (LIU et al., 2008). Essa interação entre o envelope viral e a membrana da célula do hospedeiro, leva à fusão destas estruturas e a internalização do capsídeo viral para o citoplasma celular (FERGUNSON et al., 2002; Li et al., 2016). O capsídeo viral é, então, degradado no citoplasma da célula, liberando o genoma e as proteínas virais no citosol. Uma vez dentro da célula, a transcriptase reversa associada ao vírion direciona a síntese de uma cópia de DNA (DNA complementar, ou cDNA) a partir de uma das duas moléculas de RNA de fita única, ocorrendo o processo de transcrição reversa. A integração do cDNA no genoma do hospedeiro é uma característica fundamental dos retrovírus e uma etapa essencial no ciclo de vida do HIV-1, que permite a persistência viral (CRAIGIE et al., 2012; WEI-SHAU et al., 2012; ANDERSON et al., 2018). Posteriormente, ocorre a montagem dos componentes virais para a formação da partícula viral, seguida da liberação do vírus através do processo de maturação e brotamento das partículas infecciosas, podendo infectar novas células (SIGAL et al., 2001; BRACQ et al., 2018).

A replicação viral causa progressiva perda de células TCD4⁺ e uma ampla variedade de anormalidades imunológicas, levando a um risco aumentado de complicações infecciosas e oncológicas na ausência da TARV (MOIR; CHUN; FAUCI, 2011). A infecção pelo HIV-1 também associado com maior risco de doenças cardiovasculares, doenças ósseas, disfunção renal e hepática e várias outras comorbidades (NARAYAN et al., 2014). A supressão da replicação viral com o tratamento medicamentoso permite a recuperação imunológica e retarda o desenvolvimento a aids (SUMMERS; ARMSTRONG, 2019).

Apesar dos grandes avanços na prevenção, a transmissão do HIV-1 permanece comum em muitas populações vulneráveis, incluindo homens que fazem sexo com homens, usuários de drogas injetáveis e profissionais do sexo (PATEL et al., 2014). Desde o início da epidemia de HIV/aids, 75,7 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV no mundo e 32,7 milhões foram a óbito por doenças relacionadas à aids (UNAIDS 2020). De acordo com o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/aids (UNAIDS), 38 milhões de pessoas viviam com HIV-1 em 2019 no mundo, sendo 36,2 milhões adultos e 1,7 milhão menores de 15 anos (Figura 7) (UNAIDS,.2020).

Figura 7: Estimativas de número de pessoas vivendo com HIV-1, novas infecções e mortes relacionadas à aids no mundo e de acordo com as diferentes regiões



Os números detalhados referem-se aos dados da UNAIDS para o ano de 2019, de acordo com o boletim epidemiológico de 2020 (UNAIDS, 2020)

Mesmo com a redução da mortalidade após a implementação do acesso universal ao tratamento antirretroviral, o impacto da aids no Brasil ainda é grande. De 2007 até junho de 2019, foram notificados no Sinan 300.496 casos de infecção pelo HIV no Brasil, sendo 136.902 (45,6%) na região Sudeste, 60.470 (20,1%) na região Sul, 55.090 (18,3%) na região Nordeste, 26.055 (8,7%) na região Norte e 21.979 (7,3%) na região Centro- Oeste. No ano de 2018, foram notificados 43.941 casos de infecção pelo HIV (“Boletim Epidemiológico de HIV/Aids 2019”).

Os antirretrovirais vêm demonstrando serem essenciais tanto na prevenção quanto no manejo clínico da infecção pelo HIV-1. Estudos nos últimos anos demonstraram que maiores coberturas de tratamento de pessoas vivendo com HIV-1 podem refletir diretamente nas taxas de transmissão (COHEN et al., 2016; NIELSEN-SAINES et al., 2012), visto que a supressão viral reduz a chance de transmissão (RODGER et al., 2019), uma estratégia de saúde pública conhecida como *Treatment*

as *Prevention* (TASP). Apesar da terapia ser capaz de induzir uma intensa supressão viral, a inflamação e ativação de células T permanecem elevadas e a contagem de células T CD4⁺ não atinge, na maioria das vezes os níveis de normalidade (HUNT et al., 2003; LEDERMAN et al., 2011).

1.2. Imunopatogênese da infecção pelo HIV-1

Eventos como a imunodeficiência gerada pela infecção pelo HIV-1 e ativação celular, são acompanhadas por mudanças significativas no perfil de citocinas e quimiocinas, pela presença de marcadores de ativação imunológica em diversas células do organismo, tais como células dendríticas (DC), células *Natural Killer* (NK), macrófagos, linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e células B (APPAY; SAUCE, 2008). Estas células possuem funções cruciais no curso da infecção por serem ativadas no momento da entrada do vírus no organismo.

As DCs representam um grupo heterogêneo de células especializadas na fagocitose e apresentação de antígenos, sendo primordiais para a indução e regulação da resposta imunológica (WACLECHE et al., 2018). Devido à sua localização, as DC desempenham um papel importante na disseminação do HIV para outros tecidos, uma vez que essas células são capazes de migrar para os órgãos linfoides secundários após a captura do vírus, onde promovem a propagação da infecção e a transmissão do mesmo (MARTÍN-MORENO; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, 2019). Essas células, colaboram tanto para a resposta imunológica inata, quanto para o desencadeamento da resposta imunológica adaptativa. Isso porque, produzem quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias em resposta à infecção pelo HIV-1, colaborando para uma resposta inicial mais eficiente contra o vírus por meio da migração de macrófagos e células T para o local da infecção (GREENWELL-WILD et al., 2009; MCKENNA; BEIGNON; BHARDWAJ, 2005) e também participam da regulação da diferenciação e maturação dos linfócitos T, referente a uma resposta imunológica adquirida (GREENWELL-WILD et al., 2009; WACLECHE et al., 2018).

Os principais efeitos da infecção pelo HIV-1 são uma ativação imunológica persistente e a depleção de células T CD4⁺. Esses fenômenos agem em conjunto, interferindo na representatividade e na dinâmica de maturação de diferentes subpopulações de células T, favorecendo respostas pró-inflamatórias, levando a

alterações estruturais em órgãos linfoides e a exacerbação de mecanismos de exaustão celular (FAUCI et al., 1996; OKOYE; PICKER, 2013). Podemos dizer que esses eventos atuam de forma complexa, retroalimentando uns aos outros, e influenciando na imunopatogênese da doença. O declínio dos linfócitos T CD4⁺ resultante da infecção pelo HIV, converte-se em um prejuízo generalizado no sistema imunológico, visto que há uma capacidade mais reduzida de gerar respostas contra outros antígenos.

1.3. Vacina da Febre Amarela em Pessoas Vivendo com HIV

Devido ao estado de comprometimento imunológico de PVHIV, é necessária a proteção especial contra as doenças evitáveis por vacinas, porém ainda existem muitas questões em relação a eficácia e segurança da vacinação nesses casos. Sabe-se que frente à infecção pelo HIV, há uma grande heterogeneidade de situações, desde imunocompetência no início da infecção até grave imunodeficiência com a progressão da doença.

A vacina contra febre amarela, por ser composta de um vírus vivo atenuado, é contra indicada para pessoas com imunodeficiência (risco de infecção pelo vírus vacinal), gestantes (risco de transmissão ao feto) e a indivíduos alérgicos a proteína do ovo, pois é produzida em tecidos de ovos embrionários de galinhas, podendo gerar choque anafilático (BARNETT, 2007).

Globalmente, áreas endêmicas para febre amarela, são também áreas com maior prevalência de HIV, colocando as pessoas que vivem com o vírus em risco de adquirir a infecção pela Febre Amarela. Apesar da vacina contra a febre amarela já ter sido associada a um óbito em um indivíduo com infecção pelo HIV-1 não controlada, com alta carga viral e baixas contagens de CD4⁺ (KENGSAKUL; SATHIRAPONGSASUTI; PUNYAGUPTA, 2002a), uma gama de evidências nesses participantes sugerem um perfil de segurança aceitável em pessoas vivendo com HIV/aids com contagem de células TCD4⁺ acima de 200 células/mm³(WHO, 2013).

De acordo com a Nota Informativa nº 01, da Secretaria de Vigilância em Saúde, de 23 de março de 2017, a recomendação é indicar a vacina da febre amarela para todas as pessoas vivendo com HIV-1 (PVHIV), com TCD4⁺ ≥ 350 células/mm³ que vivam em áreas de risco, e oferecer a vacina para aqueles com TCD4⁺ entre 350 e 200 células/mm³. Aqueles que apresentam imunodeficiência grave, ou seja, TCD4⁺

<200 células /mm³, não devem ser vacinados, por conta de sua imunossupressão, podendo assim apresentar respostas menos eficientes a vacina e/ou maior risco de evento adverso vacinal. Contudo, as evidências de imunogenicidade e segurança da vacina contra febre amarela em participantes vivendo com HIV-1 são limitadas a poucos estudos, em sua maioria estudos observacionais e relatos de caso (AVELINO-SILVA et al., 2016; COLIN DE VERDIERE et al., 2018; MARTIN et al., 2021; VEIT et al., 2018)VEIT et al., 2009). No entanto, em uma revisão publicada pela *Cochrane Collaboration* em 2014, que incluiu 3 estudos observacionais, concluiu que a vacina de febre amarela é segura e imunogênica, e que fatores como elevado TCD4⁺ e baixa carga viral do HIV estão associados a títulos mais elevados de anticorpos neutralizantes após a vacina de febre amarela (BARTE; HORVATH; RUTHERFORD, 2014).

A razão CD4⁺/CD8⁺ é considerada normal quando o valor está entre 1,0 e 4,0 (STRINDHALL et al., 2013), no entanto, quando um indivíduo é infectado pelo HIV, ocorre uma queda de geralmente 30% no número de células TCD4⁺, devido ao acometimento direto destes linfócitos, responsáveis pelo controle de infecções (PANTALEO; FAUCI, 1995). Em contraste, as células TCD8⁺ geralmente aumentam em cerca de 40%, devido a ação da replicação viral (SERRANO-VILLAR et al., 2014). Durante a supressão viral mediada pela terapia, alguns indivíduos que alcançam contagens de TCD4⁺ acima de 500 células/mm³ demonstram um declínio simultâneo nas contagens de CD8, relacionado com a falta de estímulo antigênico que as estava ativando levando normalização dos níveis da razão CD4⁺/CD8⁺ (DEVITT E, RODRÍGUEZ JM, POZNIAK A; 2013).

Alguns dados comparativos apoiam as recomendações para manter uma dose de reforço em participantes vivendo com HIV-1. Uma análise retrospectiva de uma coorte na Suíça relatou uma boa segurança em PVHIV com TCD4⁺ maior que 200 células/mm³, mas sugeriu uma perda mais rápida da proteção de anticorpos neutralizantes do que em não infectados pelo HIV-1 (VEIT et al., 2009a).

Em um estudo de Verdier e colaboradores, 2018, que objetivava investigar a imunogenicidade e segurança da vacina contra a febre amarela em participantes infectados pelo HIV e com número de células TCD4⁺ acima de 350 células/mm³, verificou-se alta imunogenicidade humoral da vacina 17D, tanto em PVHIV como em não infectados pelo HIV-1, com títulos de neutralização atingidos um mês após a imunização e estáveis por 12 meses (COLIN DE VERDIERE et al., 2018) .

Embora a resposta humoral desempenhe indiscutivelmente um papel central, não podemos descartar a contribuição de outras vertentes do sistema imunológico, como a imunidade celular. As células TCD4⁺ são necessárias para ativação de outras células, como os linfócitos B e os macrófagos, além de coordenar a resposta imunológica frente a infecção.

A mudança no padrão de produção de quimiocinas e citocinas ocasionadas pelo HIV-1, é constatada desde o início da infecção, sendo uma das principais responsáveis pela inflamação sistêmica observada em PVHIV, principalmente na ausência de TARV. O rápido aumento na expressão de diversas citocinas como: IL-6, IL-8, IL-18 e IL-10 é um dos eventos mais característicos da fase aguda da infecção pelo HIV-1 (MUEMA et al., 2020).

1.4. Modulação imunológica da vacina contra a febre amarela

A vacinação é o meio mais eficiente em prevenir e controlar as doenças, pois interrompe o ciclo de transmissão, e tem como principais objetivos: conferir proteção individual e coletiva na população, bloquear a propagação das doenças criando uma barreira de imunidade e, assim, prevenir as epidemias. A vacina contra a febre amarela em uso no Brasil é produzida por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ e consiste de vírus vivos atenuados da subcepa 17DD, derivada da linhagem original desenvolvida por Theiler e Smith, (1937). As vacinas contra febre amarela (17D ou 17 DD) possuem pequenas diferenças nas sequências nucleotídicas (DUARTE DOS SANTOS et al., 1995), são altamente imunogênicas (confere imunidade em 95% a 99% dos vacinados), bem toleradas e raramente associadas a eventos adversos graves, e assim, utilizadas amplamente em indivíduos que vivem em áreas endêmicas. O método de produção da vacina da febre amarela utilizado pela FIOCRUZ, consiste na inoculação do vírus 17DD em ovos de galinha embrionados (J SOPER, 1939, p. 14; LOWY, 2000, p. 6).

A vacina contra a FA é considerada uma vacina segura, no entanto devido a relatos recentes de eventos adversos após a vacinação, como o caso de transmissão do vírus pelo leite materno, levantaram preocupações e levaram a sugestões de que novas vacinas ainda mais seguras para a FA devem ser desenvolvidas (THOMAS et al., 2011). Dessa forma, novas formulações de antígenos baseados em DNA recombinante têm sido apresentadas. O vírus vacinal (YFV-17D) também tem sido

usado como base em vacinas quiméricas contra outros flavivírus de importância clínica, como o vírus do Nilo Ocidental (MONATH et al., 2006), vírus da encefalite japonesa (APPAIAHGARI & VRATI, 2010) e o vírus da dengue (GUY; SAVILLE; LANG, 2010). Estas vacinas quiméricas baseadas no genoma do vírus da FA foram consideradas seguras e altamente imunogênicas em testes pré-clínicos e clínicos (BONALDO; SEQUEIRA; GALLER, 2014). O vírus vacinal também tem sido explorado com sucesso como um vetor para a expressão de células T ou epítomos de células B, como potenciais candidatos a vacinas contra a malária (BONALDO et al., 2002). De fato, o sucesso do YF17D em apresentar uma forte imunogenicidade também como vetor viral sugere a hipótese de que a estimulação da resposta imunológica inata resulta na produção de altos títulos de anticorpos neutralizantes, de células T efectoras específicas e respostas de células TCD8⁺ de memória (FRANCO et al., 2010).

Em 2004 foi publicado por pesquisadores da FIOCRUZ um estudo duplo cego comparando as duas vacinas da febre amarela (vírus atenuado) cepa 17DD, e a cepa WHO-17D. Nele, demonstraram a taxa de soroconversão igual ou superior a 98% em indivíduos previamente soronegativos para as duas vacinas. A intensidade da resposta imunológica também foi semelhante para as duas vacinas, variando de 14,5 a 18,6 UI / mL. Neste estudo também foi detectada uma viremia entre os dias três e sete em 2,7% dos participantes vacinados (CAMACHO et al., 2004). Esta viremia subclínica também foi observada em outros estudos que concluíram que ela resulta em uma resposta de fase aguda, podendo em alguns casos ocorrer sintomas leves, semelhantes a de um estado gripal (LANG et al., 1999; MONATH; VASCONCELOS, 2015b).

A resposta imunológica a vacina da febre amarela é geralmente caracterizada pelo estímulo de uma gama de respostas imunológicas inatas, que resultarão na produção de altos títulos de anticorpos neutralizantes, de uma robusta ação de células T efectoras específicas e respostas de células TCD8⁺ de memória (MILLER et al., 2008). Além disso, a vacina induz linfócitos que produzem uma diversidade de citocinas que secretam e diferenciam-se em Th1 e Th2 (FRANCO et al., 2010). Embora as respostas por anticorpos neutralizantes historicamente tenham sido o foco de estudos sobre proteção contra a febre amarela, as células TCD8⁺ desempenham um importante papel, principalmente durante a resposta primária à vacina, controlando a infecção a partir da eliminação das células infectadas. As células TCD4⁺, irão

amadurecer e se diferenciar em Th1 ou Th2, promovendo respostas de anticorpos e células T citotóxicas mais fortes.

1.5 Inflamação e influência das citocinas

As citocinas, são proteínas com baixo peso molecular, secretadas pelos leucócitos e outras células do organismo em resposta a diferentes estímulos, atuando como mediadores das células do sistema imunológico. Interleucinas como IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, (TNF- α) e interferon gama (INF- γ) encontram-se entre as citocinas produzidas por células Th1, estando assim, associadas à resposta mediada por células, particularmente em resistência à patógenos intracelulares. As citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 pertencem à um perfil Th2, e estão envolvidas na resposta humoral e produção de IgE (HARGER et al., 1990, ROITT, BROSTOFF, MALE., 1999).

Alterações no padrão de expressão de citocinas e quimiocinas causados pelo HIV-1 são observadas desde o início da infecção e são um dos principais combustíveis para a inflamação sistêmica. Um dos eventos mais característicos da fase aguda da infecção pelo HIV-1 é o aumento rápido da secreção de citocinas inflamatórias ou reguladoras, como as interleucinas IL-6, IL-8, IL-18 e IL-10, entre outras (FREEMAN et al., 2016; MUEMA et al., 2020; STACEY et al., 2009). Esse evento conhecido como “tempestade de citocinas” é intensificado em paralelo ao aumento da carga viral (STACEY et al., 2009) e apresenta tanto efeitos positivos, como negativos.

As citocinas desempenham um papel fundamental na modulação das respostas imunológicas. Avanços no conhecimento sobre a biologia da IL-21 e sua atividade imunomoduladora têm estimulado o interesse nesta citocina em diferentes configurações clínicas e experimentais. Hoje, há evidências de um papel crítico da IL-21 na proteção contra várias infecções virais (FRÖHLICH et al., 2009; YI; DU; ZAJAC, 2009). Posteriormente, as células Th (auxiliares), Th17, e células Treg (regulatórias) foram descobertas como as principais fontes de IL-21 (ONODA et al., 2007; PARRISH-NOVAK et al., 2000). A IL-21 desempenha um papel crítico na diferenciação e no destino das células B e influencia a expressão de muitas moléculas de superfície de células B funcionalmente importantes. Estimulação direta de células B pela IL-21 induz a regulação positiva de CD19, iniciando a hipermutação somática (ETTINGER et al., 2005). Por sua vez, essa, tem capacidade de aumentar a proliferação de células T, coordenar a diferenciação de células B e aumentar a atividade citotóxica de células NK (LEONARD; SPOLSKI, 2005).

Levando em consideração que a IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia nas respostas imunológica antígeno-específicas e um dos principais mediadores da fase aguda da inflamação, pode-se considerar que essa seja uma das principais citocinas atuantes na resposta vacinal. Estudos demonstraram que em resposta a infecção, a IL-6 é prontamente sintetizada induzindo também a diferenciação de células B em plasmócitos e células TCD4⁺ imaturas em efectoras (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990). Adicionalmente, a produção de IL-6 é regulada de modo transcricional e pós-transcricional, e assim que o sistema volta à homeostase, a produção é interrompida (ANDERSON P, 2008). Na infecção pelo HIV, os níveis plasmáticos elevados de IL-6 durante a TARV têm sido consistentemente associados a um aumento da morbidade e mortalidade (TENORIO et al., 2014). Participantes infectados com HIV-1 em tratamento com antirretrovirais e com falha terapêutica são incapazes de reconstituir suas células TCD4⁺ circulantes, devido à alta replicação do vírus. Estes, possuem níveis plasmáticos elevados de IL-6, aumento do ciclo de células T de memória CD4⁺ (LEDERMAN et al., 2011) e repertório de células TCD4⁺ diminuído.

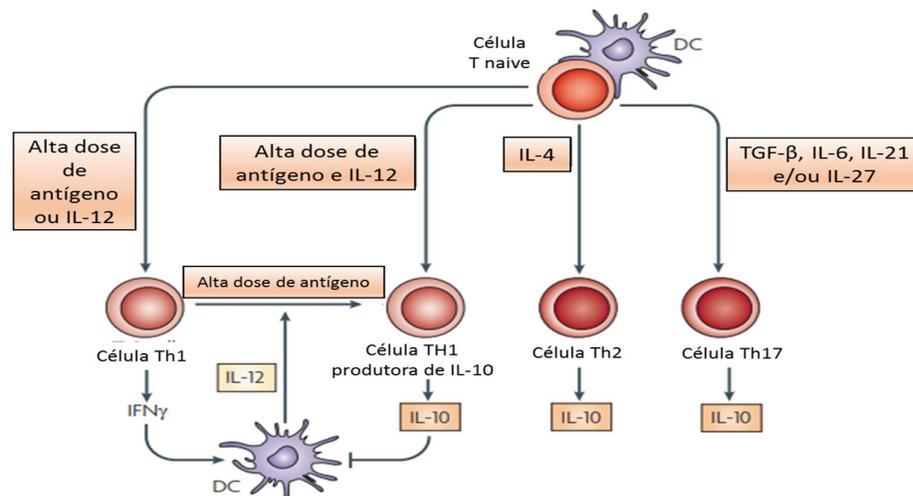
O TGF- β é uma molécula regulatória com efeitos pleiotrópicos na e sobrevivência celular, proliferação, migração e diferenciação, prejudicando vários processos biológicos, que incluem o desenvolvimento, a carcinogênese, e respostas imunológicas (BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000). O fator de transformação do crescimento beta (*transforming growth factor*, TGF- β) inibe a resposta sistêmica, mas estimula a resposta inflamatória local, e pode suprimir a proliferação e diferenciação dos linfócitos T, linfócitos B e monócitos. É sintetizado principalmente por monócitos e linfócitos TCD4⁺ que se diferenciam em células Th3 (GORELIK; FLAVELL, 2000). O TGF- β pode inibir ou estimular o crescimento de diversas células e sintetizar proteínas da matriz extracelular, além de ser um potente desativador de macrófagos, controlando o processo inflamatório e um indutor da produção de anticorpos IgA (STAVNEZER, 1995).

De forma geral, a resposta imunológica evoluiu para proteger o hospedeiro de uma gama de microrganismos potencialmente patogênicos, porém mecanismos paralelos são necessários para controlar as respostas imunológicas exacerbadas, prevenindo assim, possíveis danos ao hospedeiro. A IL-10, é uma citocina anti-inflamatória com papel crucial na prevenção de processos inflamatórios e patologias autoimunológicas (HAWRYLOWICZ; O'GARRA, 2005; O'GARRA et al., 2008). A IL-

IL-10 é expressa por muitas células do sistema imunológico adaptativo, incluindo células Th1, Th2 e subconjuntos Th17, células T reguladoras, células TCD8+ e células B (revisado por HAWRYLOWICZ; O'GARRA, 2005; RONCAROLO et al., 2006; TRINCHIERI, 2007). Também é expressa por células do sistema imunológico inato, DCs, macrófagos, mastócitos, NK, eosinófilos e neutrófilos (Figura 8). Assim, a produção de IL-10 parece estar associada a muitas células imunológicas, afirmando seu papel crucial como regulador de feedback de diversos sistemas imunológicos.

Supõe-se que, em PVHIV, a IL-10 pode causar efeitos prejudiciais ao contribuir para a diminuição da produção de citocinas Th1, como IL-2 e IL-12, e inibindo a função celular de apresentação de antígeno e a resposta imunológica mediada por células (CLERICI et al., 1994; MOORE et al., 2001).

Figura 8: Expressão da interleucina-10 no sistema imunológico.



Fonte: Giorgio Trinchieri, 2007. Em células T auxiliares (TH), a expressão de IL-10 é acompanhada pela expressão de para cada subconjunto, com exceção de células T regulatórias (TReg), que normalmente perdem a capacidade de expressar outras citocinas. Altas doses de antígenos apresentados por DCs para células T naive ou IL-12 favorecem o desenvolvimento de células TH1, que produzem interferon- γ (IFN γ). As células TH1 produtoras de IL-10 requerem uma alta dose de antígeno e sinalização de IL-12 para a expressão de níveis máximos de IL-10 após re-estimulação. Nas células TH2, a via de sinalização IL - 4 é necessária para a expressão de IL-10.

Dentre as subpopulações de células B reguladoras (Bregs), destacam-se os marcadores imunológicas CD19, CD1d, TCD4+, CD21 e as citocinas IL-10 e TGF- β (BOUAZIZ; YANABA; TEDDER, 2008; YANABA et al., 2009). Todos esses marcadores são expressos em sua maioria nas células B e a expressão conjunta tem caracterizado as Bregs, em camundongos. De fato, a maior parte da IL-10 é expressa por uma subpopulação de células B exibindo altos níveis de CD21, IgM (receptor de célula B - BCR) e CD1d (MAURI; EHRENSTEIN, 2008). A expressão do receptor

CD19 é restrita aos linfócitos B e aumenta gradualmente durante o desenvolvimento dessa linhagem celular, mas não é afetada pelo estado de ativação da célula (FUJIMOTO; SATO, 2007).

Outra molécula de interesse no estudo, é o receptor sCD163. Os receptores *scavenger* foram observados pela primeira vez em estudos para compreender a forma como o colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoproteins*, LDL) se acumulava em placas ateroscleróticas, em participantes com caso familiar de perda de receptores LDL (GOLDSTEIN; HELGESON; BROWN, 1979). Apesar do grande número de classes de receptores *scavenger* e, conseqüentemente, de uma série de ligantes, o CD163 é um dos receptores que se destacam, pois participa da homeostase e da imunidade inata em macrófagos fazendo parte do subgrupo relacionado aos receptores *scavenger* ricos em cisteína [SRCR] (KRIEGER, 1997), sendo assim, considerado uma superfamília, relacionada estruturalmente às glicoproteínas transmembranares que fazem parte da defesa imunológica inata, atuando como modelo de reconhecimento de moléculas, e, algumas vezes, com ampla especificidade.

Além de estar presente na membrana de monócitos e macrófagos, o receptor CD163 também pode ser encontrado solubilizado no plasma (DROSTE; SORG; HÖGGER, 1999). O sCD163 é resultado da clivagem do CD163 da membrana plasmática pela ação de vários fatores, tais como as metaloproteinases de matriz, cujo mecanismo pode ser avaliado *in vivo*. A concentração de sCD163 no soro ou plasma de indivíduos saudáveis é relativamente alta, e sua detecção é realizada pelo método de ELISA (SULAHIAN et al., 2001). Esses mediadores envolvidos na resposta imunológica pró-inflamatória, possuem indicadores de regulação pós-transcricional pela ação de microRNAs e serão tratados ao longo do trabalho.

1.6 Regulação Pós-transcricional por miRNA

O dogma central da Biologia Molecular se baseia na informação contida na molécula de DNA, que será expressa na forma de proteínas por meio de dois processos: a transcrição, que converte a informação do DNA em uma forma mais acessível, o RNA mensageiro (RNAm), e por meio da tradução, que converte a informação contida no RNA em proteínas (LEWIN B, 2008). Entretanto, para o funcionamento celular é necessário que a quantidade de proteína expressa por esse

mecanismo seja controlada, e para isso, as células possuem diferentes mecanismos, como fatores de transcrição e supressão, proteínas que desestabilizam o RNAm ou que reorganizam sequências de DNA próximas a genes (DALMAY, 2008). Existe também uma gama de RNAs que não são traduzidos e atuam como reguladores transcricionais e pós-transcricionais (GORODKIN; RUZZO, 2014). Um RNA não codificante (ncRNA) é uma molécula de RNA funcional que é transcrita do DNA, mas não traduzida em proteínas. Esses ncRNAs que parecem estar envolvidos em processos epigenéticos podem ser divididos em dois grupos principais; os ncRNAs curtos (<30 nucleotídeos) e os ncRNAs longos (> 200 nucleotídeos). Ambos os grupos desempenham um papel na formação de heterocromatina, modificação de histonas, direcionamento de metilação de DNA e silenciamento de genes (WEI et al., 2017). As principais classes de ncRNAs curtos são microRNAs (miRNAs) e RNAs de interferência curtos (siRNAs).

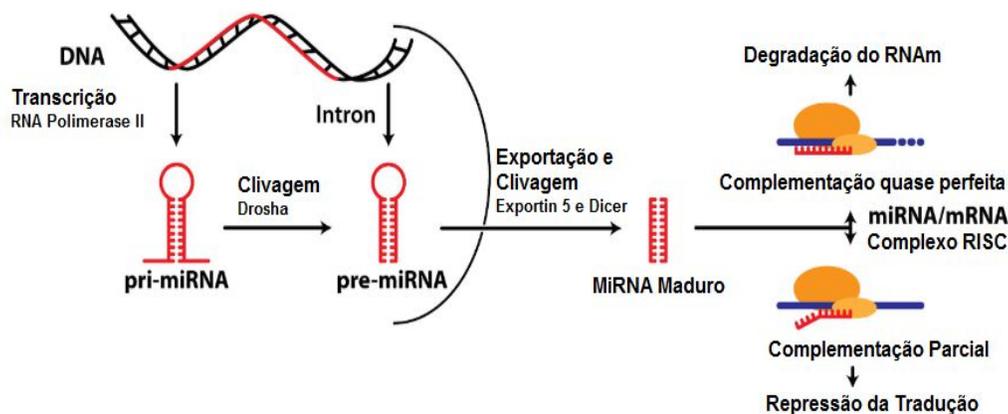
Os miRNAs são moléculas de RNA fita simples de 19–25 nucleotídeos e, como mencionado previamente, não codificadores de proteínas (KIM VN, 2005). De acordo com Kim, o Lin4 (do inglês, *lineage-deficient-4*) foi descoberto em 1993 como o primeiro miRNA, e nessa época foi associado à regulação do desenvolvimento larval da espécie de nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Em 2013, foram identificados 2.588 miRNAs no genoma humano (mirBase, 2013). Atualmente, o banco de dados miRBase já apresenta além das sequências depositadas, as notações de ontologia genética, contendo sequências 271 organismos: 38.589 pri-miRNAs e 48.860 miRNAs maduros (disponível em <http://mirbase.org/>).

Com a descoberta de que os miRNAs também auxiliam no controle da tradução e agem ligando-se ao RNAm, diminuindo sua expressão (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993), inúmeras pesquisas buscam compreender melhor suas funções e como manipulá-los. Os miRNAs regulam uma porção significativa, aproximadamente 50%, dos genes expressos no genoma humano, sendo que um mesmo miRNA pode regular múltiplos transcritos (IORIO; CROCE, 2012). Todas as famílias de miRNA sofrem uma série de etapas de biogênese que convertem o transcrito primário de miRNA no miRNA ativo com aproximadamente 22 nucleotídeos maduros.

Os miRNAs são transcritos principalmente pela enzima RNA polimerase II, originando estruturas em grampo denominadas pri-miRNAs, como pode ser observado na figura 10 (processados no núcleo). O pri-miRNA requer duas etapas de processamento da endonuclease antes de se tornar um miRNA ativo e maduro (KIM;

HAN; SIOMI, 2009). A primeira etapa do processamento ocorre durante ou após a transcrição do pri-miRNA pela enzima Drosha (BALLARINO et al., 2009; MORLANDO et al., 2008). A proteína de ligação ao RNA DGCR8 está associada a Drosha e é necessária para a clivagem do pri-miRNA (HAN et al., 2004). A clivagem de Drosha libera o precursor da haste-loop das sequências de transcrição do pri-miRNA. O precursor é exportado para fora do núcleo de maneira dependente da Ran-GTPase pela Exportina 5 (YI et al., 2003) onde, em um passo posterior, mediado pela enzima Dicer, gera a estrutura de RNA dupla fita (dsRNA), de aproximadamente 19-22 nucleotídeos, denominada miRNA. A molécula de miRNA é depois incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) enquanto que a outra cadeia é sujeita à degradação. Neste complexo, o miRNA maduro é capaz de regular a expressão gênica em nível pós-transcricional. Na maioria das vezes, ocorre o pareamento parcial ou total da fita funcional do miRNA maduro com a porção 3' não traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro (mRNA) alvo, resultando na inibição da produção de proteínas ou degradação do RNA mensageiro alvo (IORIO; CROCE, 2012). Na figura 9, ilustramos o processo de biogênese do miRNA.

Figura 9: Biogênese, processamento e maturação de miRNAs.



Fonte: adaptado de RYAN B, JOILIN G, WILLIAMS JM; 2015.

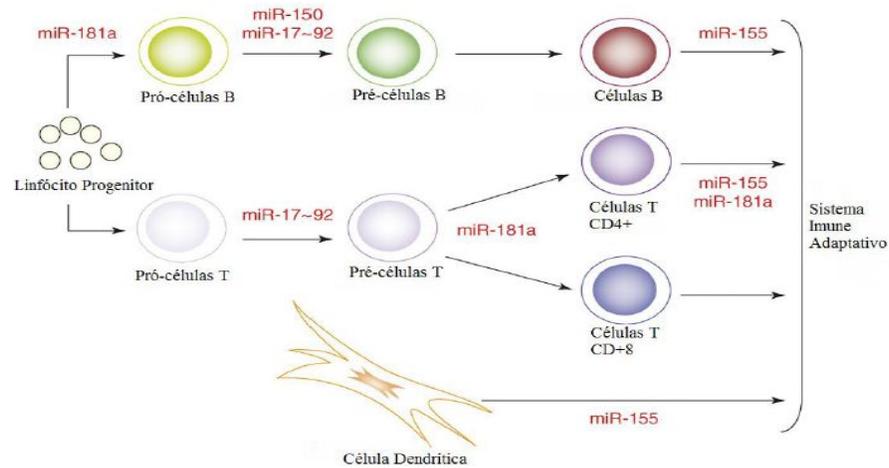
As vias de associação das enzimas Drosha e Dicer também são importantes na infecção viral e silenciamento genético. Triboulet et al. (2007) demonstraram em seu trabalho que, diminuindo a quantidade destas enzimas em células humanas, aumenta-se rapidamente a replicação do HIV-1. De acordo com o autor, vários miRNAs estão diretamente ligados à infecção viral pelo HIV-1, dentre esses pode-se citar os hsa-

miR-17-5p/3p, miR-18, miR-19a, miR-2a, miR196-1, miR-92-1, miR-122, miR-370, miR-373 e o miR-297. Diminuindo-se a expressão de Drosha e Dicer, conseqüentemente, estes miRNAs não seriam ou seriam pouco expressos (TRIBOULET et al., 2007). Os miRNAs também demonstraram regular várias funções imunológicas e são biomarcadores plausíveis de ativação de linfócitos e patogênese de doenças infecciosas e evolução clínica (ZAN; CASALI, 2015). Vários estudos forneceram evidências para a expressão alterada de miRNA em humanos infectados com vírus influenza A / H1N1 e A / H3N2, HIV-1, VZV, HBV e HCV (EGAÑ A-GORROÑ et al., 2014; MA et al., 2016). Esses miRNAs, são considerados moléculas chave na regulação da resposta imunológica, já que exercem um papel essencial no controle de processos biológicos, como a proliferação celular, o controle de migração, hematopoese, a homeostase e morte celular (BALTIMORE et al., 2008; XIAO e RAJEWSKY, 2008; RAISCH et al., 2013; LI et al., 2017). Além disso, a desregulação na expressão dos miRNAs pode levar a conseqüências patológicas importantes (MEHTA e BALTIMORE, 2016), como a evolução de doenças autoimunológicas (DENG et al., 2015) e câncer (HATA e LIEBERMAN, 2015). A figura 10 exemplifica a participação dos miRNAs no desenvolvimento e atuação dos componentes das respostas imunológicas inatas e adaptativas.

Recentemente, Haralambieva e colaboradores (2018), observaram que os miRNAs: miR-151a-5p, miR-223, miR-29, miR-15a-5p, miR-199a-3p, miR-103a e os clusters miR15a-16, possuem uma relação significativa com a atividade de anticorpos neutralizantes após a vacinação contra o vírus do sarampo. Este estudo demonstrou que a expressão do miRNA influencia também na imunidade humoral, sugerindo que eles possam ser biomarcadores preditivos para a resposta imunológica humoral protetora para o sarampo (HARALAMBIEVA et al., 2018).

Como previamente citado, os miRNAs estão envolvidos na modulação da expressão gênica tanto viral quanto celular, além da resposta imunológica mediada por citocinas. O miR-146a tem sido implicado na modulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6 (BOLDIN et al., 2011). Esse miRNA também está envolvido na regulação do sinal de transcrição do fator de crescimento transformador (TGF- β). Estudos mostraram que a via de sinalização do TGF- β engloba a via do miRNA como um componente importante de suas cascatas de sinalização (ICHIMURA et al., 2011; INUI; MARTELLO; PICCOLO, 2010).

Figura 10: miRNAs na diferenciação de células do sistema imunológico, mostrando a função dos microRNAs em cada etapa de diferenciação celular.



Fonte: Adaptado de Lindsay, 2008.

Estudos realizados em linhagens derivadas de células epiteliais e hepatócitos confirmam que o miR-21 regula processos ligados ao crescimento, migração e invasão celular (ASANGANI et al., 2008), fornecendo um mecanismo para a transformação mediada por miR-21 de células somáticas. Além disso, o miR-21 também é expresso em células hematopoiéticas do sistema imunológico, incluindo células B e T, monócitos, macrófagos e células dendríticas (SI et al., 2007).

O MiR-146a, ganhou importância significativa por ser um modulador de diferenciação e função de células da imunidade inata e adaptativa. Quanto ao papel do miR-146a nas células T, analisando a expressão de miRNAs em subconjuntos altamente purificados de células do sistema imunológico, foi verificado que o miR-146a é um dos poucos miRNAs expressos diferencialmente entre Th1 e células Th2 em camundongos, sugerindo que possa estar envolvido na determinação do destino dessas células (MONTICELLI, 2005). Um estudo realizado em camundongos deficientes em miR-146a revelou um aumento na porcentagem do subgrupo de células T produtoras de INF na ausência de miR-146a (LU et al., 2010). Nas células T humanas, o miR-146a é expresso em baixos níveis nos linfócitos T *naïve*, enquanto abundantemente expresso em células T de memória (CURTALE et al., 2010).

O miR-155 tem se mostrado importante regulador da resposta estando envolvido na regulação local das respostas de Th2 na inflamação eosinofílica induzida

por alérgenos (Y.-Q. ZHU et al., 2019). Um estudo indicou que o miR-155 possui um papel vital no desenvolvimento do sistema imunológico, na maturação, diferenciação do sistema imunológico, e na manutenção das funções imunológicas (LIND; OHASHI, 2014). Este miRNA é um regulador multifacetado atuando na proliferação celular, ciclo celular, desenvolvimento, imunidade e inflamação, com atividades contraditórias em alguns estudos oncológicos, desta forma a sua interpretação sempre levanta novas perguntas, desta forma deve-se levar em consideração todos eventos da via metabólica envolvida na análise (NARIMAN-SALEH-FAM et al., 2016).

Os relatos sobre a expressão do mir-520 são restritos a poucos estudos voltados em sua grande maioria para o câncer. Este miRNA é regulado negativamente em células de câncer de mama com alto potencial metastático em relação às células com baixo potencial metastático (CUI et al., 2010), podendo diminuir a sensibilidade dessas células cancerígenas, contornando o sistema imunológico do hospedeiro.

Como a resposta imuno-transcricional está vinculada à ativação, expressão e silenciamento de genes envolvidos nesse processo biológico, a identificação e caracterização dos miRNAs tem grande relevância para uma melhor compreensão da regulação gênica na variação de títulos de anticorpos em indivíduos saudáveis e em imunossuprimidos.

1.7 Justificativa

As evidências de imunogenicidade e segurança da vacina contra febre amarela em pacientes infectados pelo HIV-1 são limitadas a poucos estudos, em sua maioria estudos observacionais e relatos de casos (HO et al., 2008; KENGSAKUL; SATHIRAPONGSASUTI; PUNYAGUPTA, 2002b; PISTONI et al., 2017; RECEVEUR et al., 2000; SIBAILLY et al., 1997; TATTEVIN et al., 2004; VEIT et al., 2009b; WILSON, 1991). Dada a grande população de indivíduos infectados pelo HIV-1 que vivem em áreas tropicais onde a febre amarela é endêmica, a vacina pode ser uma intervenção importante para prevenir a infecção em populações imunocomprometidas.

Esse estudo faz parte de um macro-estudo já em andamento na Fiocruz, que tem como objetivo avaliar a imunogenicidade e segurança da vacina da febre amarela em pacientes infectados pelo HIV-1. Assim, o desenvolvimento deste, foi baseado no fato de que após a vacinação com o vírus atenuado da febre amarela, a replicação viral até o quinto dia pode interferir nos mecanismos celulares e alterar o perfil de miRNAs circulantes que regulam a expressão de genes envolvidos na resposta imunológica. No entanto, as citocinas e receptores no presente estudo já haviam sido pré-selecionadas, com base no subestudo da análise do impacto da resposta imune inata sobre resposta vacinal em indivíduos vivendo com HIV-1.

Já foi observado que o perfil de expressão de algumas citocinas como o interferon- γ podem restringir a replicação do vírus da febre amarela (LAM et al., 2018), com isso, procuramos avaliar a influência do nível de expressão de algumas citocinas e receptores envolvidos na resposta pró-inflamatória antes e após a vacinação contra a febre amarela.

Gaucher e colaboradores (2008) estudaram a genômica funcional associada a citometria de fluxo, objetivando definir assinaturas da resposta imunológica de indivíduos vacinados com YF-17D, comparando a resposta imunológica antes da vacinação e até um ano após. Assim, mostraram que a resposta imunológica da vacina é precedida por uma indução coordenada de fatores de transcrição que conduzem ao desenvolvimento polifuncional (GAUCHER et al., 2008). Esperamos que um dos mecanismos do sucesso da resposta protetora também ocorra por fatores funcionais da inibição de RNAm, após a transcrição, já que segundo os autores, os

miRNAs podem fornecer um link entre as vias de sinalização imunológica inata e adaptativa (O'NEILL; SHEEDY; MCCOY, 2011).

Estudar os mecanismos moleculares de ação vacinal e identificar as assinaturas que predizem a imunidade da vacina pode ser mais facilmente alcançado quando aplicado a estudos com indivíduos vacinados com o vírus da febre amarela, visto que a eficácia da vacina é ampla e estudos demonstram alterações na resposta imunológica inata, na adaptativa e na expressão de vários genes (FERREIRA et al., 2018; LI et al., 2014; NAKAYA; LI; PULENDRAN, 2012).

Como já mencionado, como os miRNAs já foram descritos por serem reguladores da resposta imunológica, pretendemos explorar o possível papel destes como biomarcadores. Como alguns miRNAs já demonstraram reprimir a expressão das citocinas pró-inflamatórias selecionadas, buscamos avaliar sua expressão diferencial na população de indivíduos vacinados vivendo com HIV-1 e não portadores do HIV-1. Assim, podemos compreender melhor e avaliar a imunogenicidade e segurança da vacina contra Febre Amarela em PVHIV.

2. Objetivo Geral

Caracterizar a expressão diferencial de RNAm para citocinas, receptores e miRNAs em PVHIV vacinados com o vírus da febre amarela 17DD.

2.1. Objetivos específicos

- Correlacionar a quantificação de linfócitos TCD4⁺ dos participantes com a titulação de anticorpos neutralizantes anti-febre amarela.
- Avaliar a expressão relativa das citocinas (IL-6, IL-10, IL-21, TGF- β), e dos receptores (CD19 e CD163) antes da vacinação (D0) e no Dia 5 após a vacina (D5); e posteriormente avaliar a expressão gênica diferencial.
- Verificar o padrão de expressão dos miRNAs (mir-21, mir-155, mir-146 e mir-520) antes da vacinação (D0) e após (D5).
- Associar o padrão de expressão dos miRNAs com a expressão diferencial das citocinas e receptores.

3. Materiais e Métodos

3.1 Desenho do estudo

O presente estudo faz parte de estudo clínico de fase IV com o objetivo de avaliar a imunogenicidade e segurança da vacina contra Febre Amarela em participantes infectados pelo HIV-1, sendo este longitudinal prospectivo não randomizado, conduzido no contexto da rotina de atendimento do hospital do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. O sub-estudo apresentado nesta dissertação, possui as mesmas características e critérios de elegibilidade dos participantes. Contudo, trata-se de uma amostragem não probabilística de conveniência dos participantes do estudo. Foram analisados 70 participantes e suas amostras de PBMCs foram coletadas em dois momentos, no dia da vacinação e 5 dias após, as quais foram submetidas aos ensaios de quantificação de RNA mensageiros de quatro de citocinas, receptor de células B (CD19) e receptor de macrófagos e monócitos (CD163) ajustados pela expressão da quantificação dos genes endógenos. Em 48 dos 70 participantes foi realizada a detecção dos miRNAs (mir-21, mir-146, mir-155 e mir-520). Desta forma, foram analisadas 236 amostras (em duplicata) frente a 10 alvos e 3 controles endógenos. Também foram avaliadas as coletas do dia 30 referentes aos ensaios de neutralização.

O projeto foi cadastrado na plataforma Brasil, CAAE: 67136517.9.0000.5262 e aprovado no comitê de ética com o número 2.890.564.

3.2 Casuística e critérios de inclusão no estudo:

- Capacidade e vontade do participante de assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).
- Homens e mulheres vivendo com HIV-1 com idade entre 18 anos de idade e 59 anos, com contagem de CD4⁺ > 200 no último exame que precede a inclusão (pelo menos 6 meses antes).
- Homens e mulheres não infectados pelo HIV-1 (teste rápido anti-HIV negativo na inclusão) sem história médica significativa, e com exame físico na inclusão sem alterações clínicas significantes.
- Sem antecedentes de vacinação contra febre amarela (auto afirmação do participante).

3.3 Visitas do estudo:

As coletas de sangue para este projeto foram realizadas em duas visitas. Na tabela 1, listamos as informações para fins comparativos do material que foi obtido em cada visita.

Tabela 1: Procedimentos clínicos realizados com os participantes do estudo, por visita.

Visita 1 - Inclusão (Dia zero)	Visita 2 (Dia 5)	Visita 3 (Dia 30)
História médica	TCD4 ⁺ , CD8 e HIV-RNA de entrada para os participantes do grupo de PVHIV e atualização de história médica	TCD4 ⁺ , CD8 e HIV-RNA para os participantes
TCD4 ⁺ , CD8 e HIV-RNA de entrada para os participantes do grupo de PVHIV	Captura e registro de eventos adversos	Ensaio de neutralização (PRNT)
Teste rápido anti-HIV para os candidatos HIVneg	Coleta de sangue, processamento e armazenagem para quantificação de viremia pelo vírus vacinal	
Coleta de sangue, processamento e armazenagem para exames de entrada (hemograma, AST, ALT, bilirrubinas).	Coleta de sangue, processamento e armazenagem para exames de segurança (hemograma, AST, ALT, bilirrubinas)	
Coleta de plasma e PBMC para estudos de imunidade inata, imunoativação e caracterização de miRNAs.	Coleta de plasma e PBMC para estudos de imunidade inata, imunoativação e caracterização de miRNAs.	

3.4 Obtenção e contagem de células mononucleares do sangue periférico

Para obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC, utilizamos 40 mL de sangue coletado em tubos contendo heparina, centrifugado a 1500 x g por 10 minutos. O plasma foi previamente separado da porção celular após centrifugação a temperatura ambiente e armazenado no freezer a -70°C. O sangue, diluído com PBS (salina tamponada com fosfato) 0,01 M, pH 7,2 e então, foi adicionado lentamente ao reagente Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich Company, Saint Louis, MO, EUA), na proporção de 2:1, seguido de centrifugação por 30 minutos a 1500 x g. Em seguida, o anel leucocitário foi formado, coletado e transferido para outro tubo de 15 mL onde foi lavado com PBS, sendo submetido à centrifugação por 10 minutos a 1500 x g. O precipitado formado foi ressuspenso em 10 mL de PBS. Foi realizada a contagem das células e determinação da viabilidade das PBMC,

armazenadas em nitrogênio líquido na concentração de $5-10 \times 10^6$ células / mL em solução contendo 90% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido.

3.5 Ensaio de Neutralização por anticorpos

Com intuito de correlacionar os dados de expressão gênica das citocinas e miRNAs, com os títulos de anticorpos neutralizantes anti-YF17D, foi utilizado o teste de neutralização por redução de placas de Lise (PRNT). O PRNT possui a capacidade de detectar os anticorpos neutralizantes, permanecem por muitos anos e são protetores, reduzindo ou eliminando a infecciosidade do vírus (ROEHRIG JT, HOMBACH J & BARRETT AD., 2008). A titulação de anticorpos foi realizada em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos (LATEV/BIO). Indivíduos que apresentaram títulos de neutralização maiores que 1:100, obtiveram soroconversão.

Para comparar médias dos resultados de neutralização de cada um dos grupos, utilizamos o método Tukey Honest Significant Difference.

3.6 Citometria de Fluxo

As contagens absolutas de linfócitos TCD4⁺ foram obtidas a partir do sangue total utilizando o kit MultiTest TruCount-kit e o software MultiSet no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, EUA). A carga viral plasmática do HIV-1 das amostras correspondentes a coleta realizada no presente estudo foi mensurada usando o kit Abbott RealTime HIV-1 assay (Abbott Laboratories, EUA). Essas análises foram realizadas no laboratório de Aids e Imunologia Molecular (IOC) em colaboração a Plataforma de Laboratório Multiusuário (PLATLAB), INI, Fiocruz.

3.7 Citocinas e Receptores

3.7.1 Extração de RNA Total

As PBMC criopreservadas (contagem de células entre 5.10^6 e 1.10^7) foram descongeladas e centrifugadas a $2.000 \times g$ por 5 min. As etapas subsequentes foram realizadas seguindo o protocolo do Mini Kit em colunas Pure Link RNA Mini Kit (Invitrogen™) com adaptação na etapa de adição de etanol para recuperar pequenos RNAs junto ao RNA total, adicionando assim o volume de 750 uL de etanol absoluto, seguido da centrifugação e lavagem. Por fim, foram obtidas as quantidades de 35 uL de RNA que foram armazenados a -80°C .

Para avaliar a integridade do RNA realizamos a técnica de eletroforese em gel de agarose, a fim de observar as bandas 28s e 18s e 5s referentes ao RNA ribossomal. Cada amostra de RNA foi misturada no carreador azul de bromofenol, no corante fluorescente Gel Red e submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBS 1x, por 40 minutos a 100 volts, para avaliação da mobilidade do RNA. Para a visualização do mesmo, utilizamos o transluminador na presença de luz ultravioleta, e em seguida, o resultado foi fotodocumentado.

Para a obtenção da quantificação dos ácidos nucleicos, o utilizamos o Espectrofotômetro Thermo Scientific™ *NanoDrop* 2000 e consideramos a razão 260/280 para avaliar o nível de pureza do material. Com o intuito de verificarmos se nossa quantificação estava correta, comparamos nossa análise com a integridade do RNA observada através do equipamento Bioanalyzer (Agilent Technologies), que funciona como uma eletroforese automatizada.

3.7.2 Reação de Transcriptase Reversa

O sistema de síntese de cDNA SuperScript® IV (Invitrogen™) para RT-PCR é otimizado para sintetizar o DNA complementar da primeira fita a partir da cauda poli (A) + ou RNA total purificado. A enzima é usada para sintetizar cDNA em uma faixa de temperatura de 50° a 55 °C, fornecendo especificidade aumentada, rendimentos mais altos de cDNA e produto mais completo do que outras transcrições reversas.

As amostras foram submetidas a uma primeira etapa de desnaturação a 65°C por 5 minutos, seguida por uma incubação a 23°C por 10 minutos. Em seguida, a reação foi incubada em 50–55 ° C por 10 minutos e inativada a 80 ° C por 10 minutos. Para essa técnica, utilizamos iniciadores aleatórios (50 µM, Invitrogen™). O cDNA obtido foi quantificado no Nanodrop 2000 e armazenado a -30°C.

3.7.3 Expressão Gênica através da PCR quantitativa (qPCR)

A técnica PCR em tempo real (qPCR), vem sendo empregada em numerosos estudos de análises de expressão gênica, pois sua alta sensibilidade permite a quantificação de transcritos raros e pequenas mudanças na expressão gênica. Os métodos mais utilizados na quantificação de RNA por qPCR são: a quantificação absoluta (fornece o número de cópias do transcrito de interesse, a qual é obtida por meio de uma curva padrão) e a quantificação relativa (os níveis de expressão são mensurados por meio de gene alvo e gene controle, sendo que o controle deve

apresentar níveis de expressão estáveis em diferentes análises) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Nossos resultados foram analisados pelo método da quantificação relativa para avaliar a variação da expressão de seis genes alvo utilizando dois genes controle (Tabelas 2 e 3). Selecionamos as citocinas e receptores que foram indicados previamente com base na resposta contra febre amarela segundo Querec et al., 2006 (QUEREC et al., 2006) e indicados por Jue Ho et al. 2017 (HUANG et al., 2018).

O ensaio de qPCR foi realizado utilizando o kit comercial TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, Cal.) para cada alvo. Os genes endógenos utilizados como normalizadores nos ensaios de expressão gênica foram o da β -actina (ACTB) e do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Tabela 2: Genes endógenos humanos utilizados para a análise da expressão gênica.

Gene	Nome do gene	Função Biológica	Ensaio ID	Tamanho (aa)	Localização no cromossomo
ACTB	Beta actina	Proteína do citoesqueleto	Hs99999903_m1	375	7
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Envolvido na glicólise	Hs02758991_g1	355	12

Fonte: Applied Biosystems (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/applied-biosystems.html>.)

Para a realização do ensaio de qPCR, os cDNA foram utilizados em duplicata na quantidade inicial de 2500 ng/uL por reação, em um volume final de 20 μ L (já contendo o cDNA). Foram adicionados a cada poço (ABI Prism optical plates, Applied Biosystems), 10 μ L de 2X TaqMan Universal Master Mix (1X) contendo: AmpliTaq Gold 250U, AmpErase UNG, 10X Taqman Buffer A e dNTPs, e 1 μ L 20x ensaio TaqMan contendo iniciadores e sondas específicas para as moléculas de interesse: IL-6, IL-21, TGF- β , IL-10, CD19, CD163 e para os controles endógenos: β -ACTINA e GAPDH (Applied). Todo material foi amplificado, em um total de quatro etapas: 1 ciclo a 50°C por 2 min, para a ativação da enzima AmpErase UNG, 1 ciclo a 95°C por 10min para a ativação da AmpliTaqGold DNA polimerase e 50 ciclos contendo etapas

de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguidos pelas etapas de hibridização e a extensão a 60°C por 1 min. A variação nos níveis de expressão dos genes de interesse foi calculada a partir da variação entre os valores do ciclo de *threshold* (CT) deste gene e dos controles endógenos (Δ Ct).

O cDNA de referência para as citocinas estudadas foi constituído pela mistura de vários cDNAs produzidos a partir do RNA das próprias amostras incluídas no estudo. As amostras foram avaliadas em duplicata para cada uma das citocinas e receptores de interesse, para o gene da β -actina e para o GAPDH.

As amplificações foram realizadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies/EUA), e as características dos genes e receptores moleculares e estão descritos abaixo.

Tabela 3: Genes codificadores para citocinas humanas utilizadas na análise da expressão gênica.

Gene	Nome do gene	Número de acesso	Função Biológica	Ensaio ID	Tamanho (aa)	Localização no cromossomo
TGF- β	Fator de Crescimento e Transformação Beta	[RefSeq: NM_000660.5]	Codificação de proteína	Hs00998133_m1	390	12
IL-6	Interleucina 6	[RefSeq: NM_000600.4]	Codificação de proteína	Hs00985639_m1	212	7
IL-10	Interleucina 10	[RefSeq: NM_000572.2]	Codificação de proteína	Hs00961622_m1	178	1
IL-21	Interleucina 21	[RefSeq:NM_001207006.2]	Codificação de proteína	Hs00222327_m1	162	4
CD19	Molécula CD19	[RefSeq:NM_001178098.1]	Receptor de Células B	Hs00174333_m1	556	16
CD163	Receptor CD163	[RefSeq:NM_00104244.5]	Antígeno associado a macrófagos	Hs00174705_m1	1156	12

Fonte: Applied Biosystems (<https://www.thermofisher.com/br>).

3.8 microRNAs

3.8.1 Extração de miRNA

Para a extração dos miRNAs, utilizamos o kit de isolamento *mirVana*™ (Invitrogen™) que recupera efetivamente todo o RNA (de mRNA grande e RNA

ribossômico com até 10 nucleotídeos). O kit de isolamento mirVana™ miRNA permite o isolamento de pequenos RNAs totais contendo RNA de amostras que consistem em 10^2 a 10^7 células.

As PBMC foram descongeladas, ressuspendidas em 9mL de PBS 1x e centrifugadas a 2.000 x g por 5 min. Em seguida, foram adicionados 500uL do tampão de lise mais 1/10 (do volume no *ependorf*) do aditivo de miRNA. Após incubar o material no gelo (0 - 4°C) por vinte minutos, adicionamos a mesma quantidade de ácido Fenol-Clorofórmio seguido de mais uma centrifugação de 5 minutos, para compactar as fases. Recuperamos o estágio aquoso e adicionamos 1/3 de etanol 100% para assim inserirmos no filtro de coleta. O filtrado foi coletado e adicionado a uma nova coluna com mais 2/3 (do volume total) de etanol absoluto, e centrifugado. A partir de então, demos início as lavagens, eluímos o mirRNAs em 30uL e estocamos a -70°C. Para subsequente obtenção da quantificação dos ácidos nucleicos, utilizamos o Espectrofotômetro Thermo Scientific™ *NanoDrop* 2000 e consideramos a razão 260/280 considerando o nível de pureza do material.

3.8.2 Reação de Transcriptase Reversa

Para a síntese do cDNA, utilizamos o kit cDNA Advanced miRNA Assays conforme recomendado pelo fabricante (Applied Biosystems). Em um tubo de 1,5 mL, foi preparada uma mistura de reação da cadeia PolyA. Em seguida, adicionamos 2 µL de amostra em cada *ependorf* (0,2) de reação e, em seguida, transferimos 3 µL da reação a eles. O material foi incubado no termociclador com a seguinte ciclagem: 37°C por 45 minutos e 65°C por 10 minutos.

Na reação de ligação (2ª etapa), inserimos os reagentes: 5X DNA Ligase Buffer, 50% PEG 8000, 25X Ligation Adaptor, RNA Ligase, RNase-free water, e transferimos 10 uL para a reação da cadeia PolyA após finalizada a primeira incubação. Em seguida, inserimos novamente no termociclador por 60 minutos a 16°C.

Após o término da etapa de ligação, seguimos para etapa de transcrição reversa (RT). Assim, em um tubo de 1,5 mL preparamos o mix inserindo: *5X RT Buffer*, *dNTP Mix*, *20X Universal RT Primer*, *10X RT Enzyme Mix* e água livre de nuclease, com um total de 15 uL por tubo. Estes 15 uL foram inseridos no produto da reação de ligação. Novamente, os tubos foram alocados no termociclador sob ciclagem de 42°C por 15 minutos e 85°C por 5 minutos.

A quarta e última reação é referente à amplificação do miRNA. Em um novo tubo de 1,5 mL preparamos o mix com os seguintes reagentes: 2X miR-Amp Master Mix, 20X miR-Amp Primer Mix, RNase-free water, contabilizando 45uL de mix. Adicionamos a essa reação 5uL do produto da reação de RT e seguimos com a ciclagem de 14 ciclos de 95°C por 5min, 14 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos e um ciclo de 99°C por 10 minutos. O produto final foi armazenado a -20°C até ser utilizado na PCR em tempo Real.

3.8.3 Expressão Gênica através da PCR quantitativa (qPCR)

Com intuito de avaliarmos a expressão gênica dos miRNAs de interesse do estudo, utilizamos o kit: TaqMan Advanced miRNA Assays com os cDNAs obtidos através do TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit. Após descongelarmos e centrifugarmos os ensaios, realizamos uma diluição 1:10 a partir de uma concentração de 2000 ng/uL do cDNA realizado com tampão TE 0,1X.

Em um tubo de 1,5 mL, adicionamos o Master Mix Advanced TaqMan Fast, 1uL do ensaio do miRNA, e 4 uL de água livre de RNase por reação. Depois de distribuir o mix em cada tubo, adicionamos o cDNA diluído para cada reação. Utilizamos a ciclagem descrita na tabela no equipamento 7500 Fast *Applied Biosystems*.

Tabela 4: Ciclagem utilizada para os ensaios TaqMan Advanced miRNA Assays

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da Enzima	95°C	20 segundos	1
Desnaturação	95°C	3 segundos	40
Hibridização/Extensão	60°C	30 segundos	

O gene endógeno utilizado como normalizador nos ensaios de expressão gênica dos miRNAs, foi o mir-26a devido a sua estabilidade de expressão (RAGNI et al., 2019; TIMONEDA et al., 2012), representado na tabela 5.

Tabela 5: Gene endógeno utilizado para a análise da expressão gênica.

Gene	Nome do gene	Ensaio ID	Localização do cromossomo
mir 26a	MicroRNA 26a	Hs04231546_s1	Chr.12: 57824609

Fonte: Applied Biosystems (<https://www.thermofisher.com/br>).

Quanto aos mirRNAs avaliados no decorrer do trabalho, listamos na tabela 6, os que foram selecionados com base na sua função biológica e relação com as citocinas avaliadas no estudo.

Tabela 6: Genes codificadores para citocinas humanas utilizadas na análise da expressão gênica.

Gene	Nome do gene	Ensaio ID	Localização do cromossomo
Mir-146a	microRNA 146a	Hs00864057_g1	Chr.5: 160485352
Mir-21	MicroRNA 21	Hs04231424_s1	Chr.10: 73902210
Mir 155	MicroRNA 155	Hs01374569_m1	Chr.21: 25562145
Mir520	MicroRNA 520	Rh04418443_sH	Chr.19: 53482616

Fonte: Applied Biosystems (<https://www.thermofisher.com/br>).

Como já mencionado para as citocinas, o cDNA de referência para os miRNAs avaliados, consistiu por um *pool* de RNA das amostras com concentração de aproximadamente 2000 ng/uLe posteriormente foi diluído na razão de 1:10 em água ultrapura estéril. As diluições foram testadas em duplicatas por qPCR para cada um dos miRNAs e para o controle mir26-a.

3.9 Análises dos dados

As análises das reações de expressão relativa das citocinas, receptores e miRNAs, foram realizadas inicialmente no programa *Cloud*, disponível no site da Thermo Fisher Scientific. Este software utiliza os dados online, utilizando o método do CT comparativo proposto por Livak e Schmittgen em 2001 gerado a partir da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Nessa técnica foi realizada a normalização da quantificação da expressão gênica a partir da quantificação dos genes utilizados como controles endógenos, no nosso caso, beta-actina, GAPDH e mir-26a.

Os dados gerados pelo equipamento foram inseridos no programa *Cloud*, e nele foi inicialmente calculado o ΔCt (CT gene do estudo – CT genes endógenos). Organizamos esses valores em planilhas utilizando o programa Excel (Microsoft) e realizamos todos os cálculos para chegar na quantificação relativa ($\Delta\Delta Ct$).

O ΔCt de cada indivíduo no dia cinco foi diminuído do ΔCt que ele apresentou no dia zero, gerando assim o valor de $\Delta\Delta Ct$. A quantidade do gene-alvo foi normalizada com uma referência endógena convertida em quantificação relativa pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, para obtenção do *fold change*.

A expressão relativa dos alvos, obtida a partir do *fold change*, representa quantas vezes o gene alvo está mais expresso em relação ao controle. Valores acima de 1 foram considerados aumentados e entre zero e 1, diminuídos. As amostras consideradas *outliers* foram repetidas e avaliadas individualmente.

Utilizando o valor de *fold change* final, os gráficos foram gerados no programa GraphPad Prism versão 9. Para a associação dos nossos grupos que não possuem distribuição normal, utilizamos o teste Mann-Whitney. Para a comparação entre mais de dois grupos sem distribuição normal, empregamos o teste Kruskal- Wallis. Foram considerados estatisticamente significativos valores de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e sugestivo quando $p < 0,1$.

Para correlacionar os resultados de *fold change* dos miRNAs e citocinas, utilizamos o teste de Correlação de Pearson também no programa Prism9.

4.0 Resultados

4.1 População de estudo

Na tabela 7, destacamos os dados sociodemográficos dos 70 indivíduos participantes do estudo. Destes, 50 vivem com o HIV-1 e 20 participantes HIV negativos compuseram o grupo controle. A mediana da idade está apresentada juntamente com os quartis 1 e 3 (Q1 e Q3), assim como o número absoluto de participantes separados por sexo. A idade dos participantes é referente ao momento em que iniciaram sua participação no estudo.

Tabela 7: Características demográficas dos participantes do estudo.

		Total	HIVneg	PVHIV
Idade		43 (31-47)	39 (28-44)	44 (35-48)
[Mediana (IQQ)]				
Sexo	F	22 (31.42%)	9 (12.9%)	13 (18.6%)
[n (%)]	M	48 (68.57%)	11 (15.7%)	37 (52.9%)

IQQ: Intervalo interquartil

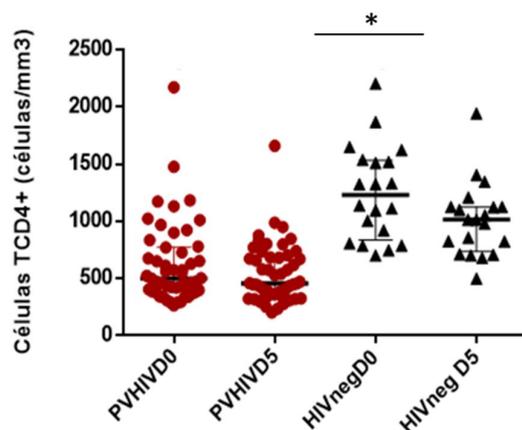
Os dados clínicos e laboratoriais dos participantes estão apresentados no apêndice I (tabela suplementar 1). Observamos que alguns pacientes apresentaram alterações, principalmente na bilirrubina no quinto dia após a vacinação, porém quando verificadas individualmente, essas alterações não implicam em uma diferença na mediana dos *fold changes* das citocinas, receptores e miRNAs.

4.2 Contagens de Linfócitos TCD4⁺ dos indivíduos do estudo

Para a realização dos ensaios, foram consideradas as contagens de células T CD4⁺ realizadas nas coletas D0 e D5 dos 70 indivíduos recrutados. Entre PVHIV, no D0, a mediana de CD4 era 654 células/mm³ (intervalo interquartil 435-1023), todos os participantes tinham carga viral HIV RNA <40 cópias/mL e todos os participantes usavam terapia antiretroviral. Na figura 10, é possível observar a distribuição das medianas dos valores de células TCD4⁺/mm³ nos grupos de análise: participantes com *status* sorológico positivo e negativo para infecção pelo HIV-1 nos dois momentos avaliados. Com um valor de $p < 0,01$, observamos diferença estatisticamente relevante no grupo controle contagem de células TCD4⁺. Podemos afirmar nessa análise que o

grupo controle no quinto dia após vacinação, apresentou uma queda significativa desses linfócitos.

Figura 10: Contagem de células T CD4⁺/mm³ dos participantes antes (D0) e após (D5) a vacinação.

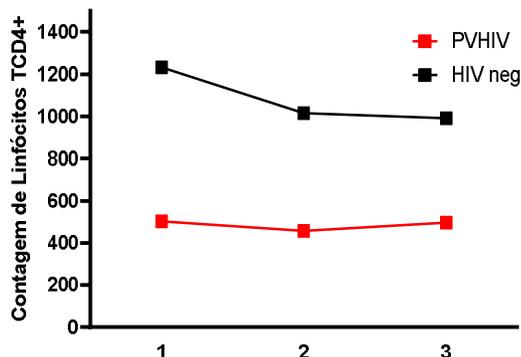


Triângulos indicam o grupo controle e círculos indicam indivíduos PVHIV. Barras horizontais pretas representam os intervalos de confiança de 95%. Foram considerados significativos os valores: * $p < 0,05$.

Após observarmos que os grupos apresentaram queda de CD4⁺, principalmente o grupo controle, buscamos a contagem desses linfócitos dos participantes na visita do dia 30 e correlacionamos de acordo com a figura 12. Observamos no gráfico as medianas da contagem de linfócitos TCD4⁺ nos dias zero, cinco e 30 (correspondente ao retorno dos participantes na visita de um mês e respectiva titulação de anticorpos).

No gráfico, observamos que o grupo HIVneg perdeu mais células após a aplicação da vacina comparado com o grupo PVHIV. Nesse grupo, não observamos a recuperação de células prevista 30 dias após a vacina, contudo no grupo PVHIV, observamos um leve aumento de células no dia 30, porém não retornam aos níveis basais, conforme a figura 11.

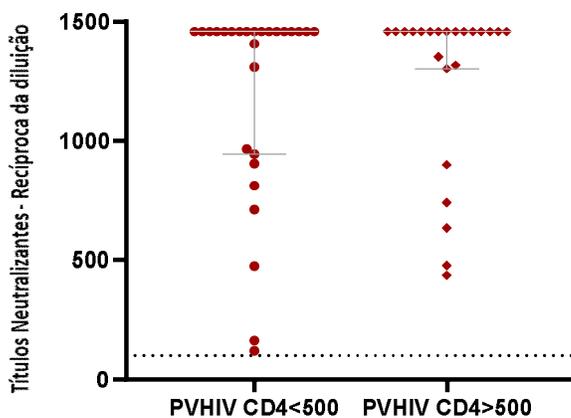
Figura 11: Mediana da contagem de células TCD4⁺ nas visitas de dia 0, dia 5 e 30.



Quadrados em preto representam as medianas do grupo controle e quadrados em vermelho representam as medianas do grupo PVHIV.

Quanto ao grupo PVHIV, 27 dos 50 indivíduos apresentaram contagens de linfócitos TCD4⁺ abaixo de 500 células/mm³ e 23 apresentaram contagens acima de 500 células/mm³. Essa contagem diminuída já verificada em indivíduos portadores do HIV não parece afetar na produção de anticorpos um mês após a aplicação da vacina segundo a figura 12. Nesse gráfico, apresentamos no eixo y a titulação de anticorpos neutralizantes e no eixo x as contagens de células TCD4⁺ do grupo PVHIV no dia cinco, separado pela contagem de linfócitos. Observamos que ambos os grupos apresentaram altos títulos de anticorpos independente da contagem de células. O ponto de corte de positividade para soroconversão é 100 e todos os participantes apresentaram títulos acima, inclusive os outliers.

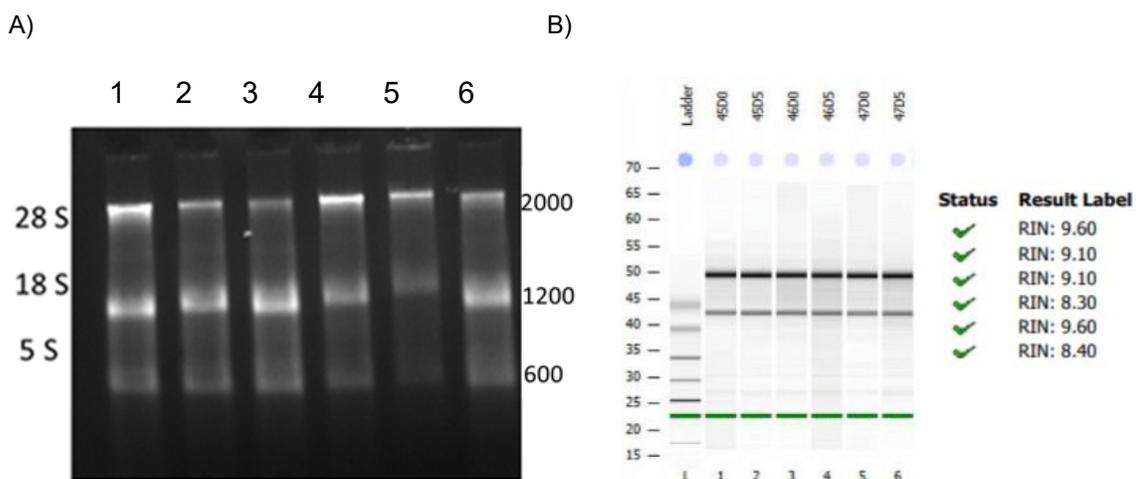
Figura 12: Títulos Neutralizantes (Dose Inibitória de 50% (ID50) no dia 30 para o grupo PVHIV com contagens de células TCD4⁺ <500 e >500 no dia 5.



4.3 Padronização da Técnica de Extração de RNA

Para avaliar a integridade do RNA realizamos a técnica de eletroforese em gel de agarose, a fim de observar a presença das bandas 28S e 18S e 5s referentes ao RNA ribossomal (Figura 14a). Já para a obtermos a quantificação dos ácidos nucleicos, o utilizamos o Espectrofotômetro *NanoDrop* 2000 e consideramos a razão 260/280 observando o nível de pureza do material. Comparamos o mesmo material no Bioanalyzer da Agilent, que fornece uma avaliação qualitativa e semiquantitativa da integridade do RNA (Figura 14b). Neste, inserimos 1uL das amostras no chip a fim de avaliar a concentração e integridade do RNA. Após, constatamos que o material estava íntegro a partir do valor do RIN (integridade do RNA), e mantivemos nossas análises com o Nanodrop 200 e o gel de agarose.

Figura 14: Análise de integridade do RNA total.



A) Eletroforese em gel de agarose 1%. Marcador de massa molecular Low DNA Mass ladder: 100 pb a 2,000 pb pares de base. Os poços 1 a 6 são amostras de pessoas vivendo com HIV e mostram a separação por tamanho das subunidades do RNA, evidenciando a subunidade 28 com 2500 pb, a subunidade 18 com 1000 pb e a subunidade 5 com 800 pb. B) Análise de integridade do RNA (RIN). Programa: Agilent 2100 Bioanalyzer. Concentração Ladder [ng/μl]: 150.

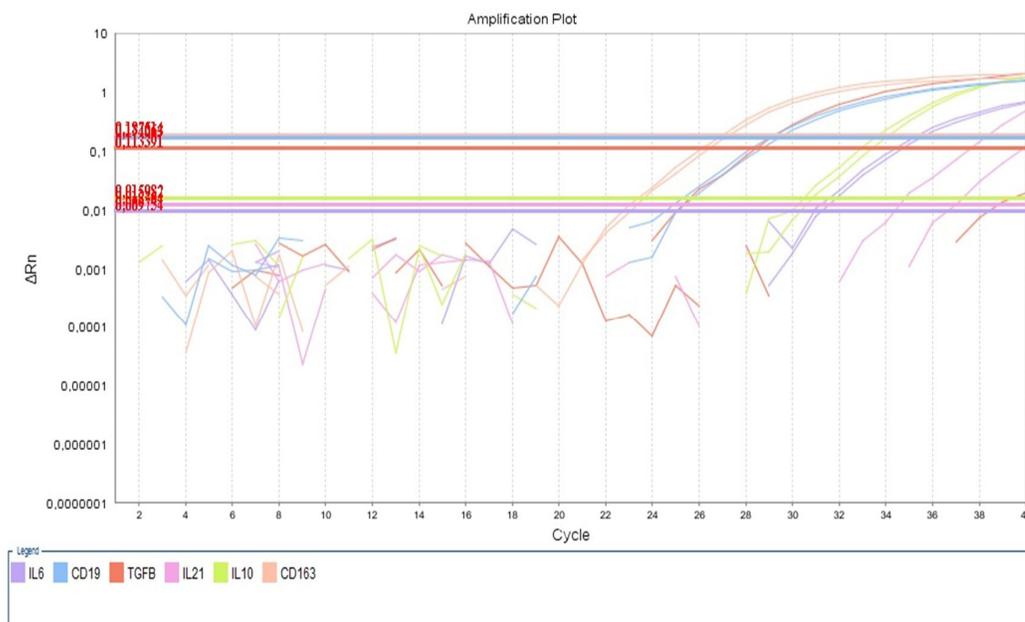
4.4 Interferência Heparina

Devido ao fato de os indivíduos incluídos no estudo fazerem parte de um projeto maior, as amostras haviam sido coletadas previamente em heparina. É descrito que amostras coletadas com heparina podem apresentar inibição da amplificação dos ácidos nucleicos para o alvo pesquisado por RT-qPCR, podendo impossibilitar a sua detecção (HOLODNIY et al., 1991). Sendo assim, após a extração de RNA e obtenção do cDNA, realizamos a PCR do gene controle da β -globina (268 pares de base) da amostra de um participante do estudo coletada tanto em heparina quanto em EDTA. Os iniciadores utilizados para essa reação foram: PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3) e GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3), descritos por BELL et al; 1993. Observamos na eletroforese em gel de agarose que a mesma amostra amplificou tanto na coleta em EDTA quanto em heparina, o que nos fez seguir as análises com esse material após a testagem.

4.5 Padronização da reação de PCR em Tempo Real

Para obtermos a eficiência da amplificação realizamos uma curva padrão para as citocinas e receptores selecionados, construímos um pool de cDNA com 1 uL das amostras de RNA, e realizamos uma diluição seriada partindo de 2.500 ng a 16 ng. Portanto, o limite mínimo de detecção das citocinas testado foi de 16 ng de cDNA e as sondas alvos que captaram moléculas de mRNA nessa diluição e seus respectivos *threshold cycles* (CTs) foram: CD19 (CT: 36,7), IL-10 (CT: 37,1), CD163 (CT: 35,8), TGF- β (CT: 36,9). O alvo para a citocina IL-21 apresentou um limite de detecção de 515 ng com CT: 34,4 e o alvo da citocina IL-6 apresentou um limite de detecção de 2,5 ug com CT: 31,3. Diante destes resultados definimos como padrão utilizar aproximadamente 1 ug de RNA (Figura 15).

Figura 15: Limite de detecção do pool em cada alvo a partir de uma diluição seriada partindo de 2,5 ug a 16 ng.



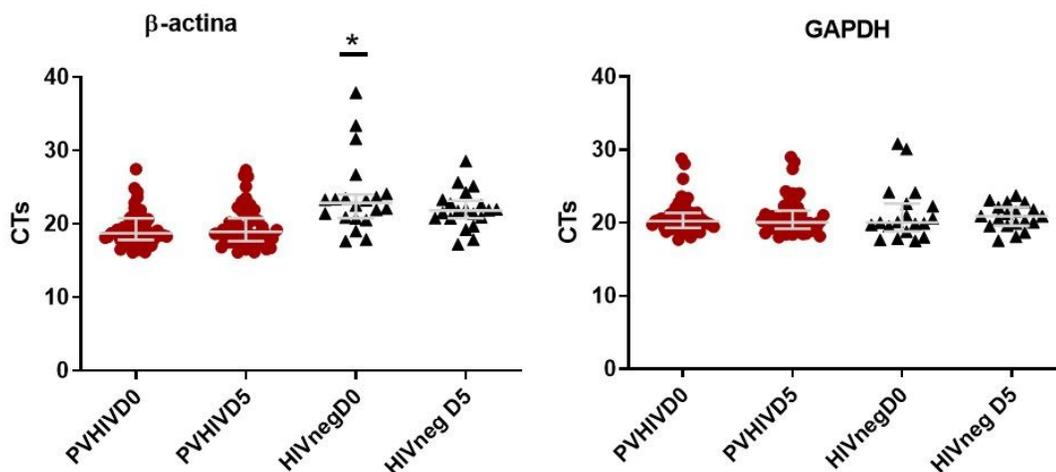
Nesta figura, apresentamos os pools referentes aos 6 alvos do estudo: IL-6, CD19, TGF- β , IL-21, IL10 e CD163, apresentados conforme a legenda. Equipamento PCR em tempo real utilizado: Fast 7500.

4.6 Estabilidade de expressão dos genes endógenos das citocinas

Na figura 16, apresentamos no eixo Y, os valores de CT de todas as amostras do estudo em D0 e D5. Observamos em ambos os gráficos que tanto a expressão da β -actina quanto do GAPDH foram constitutivas nas PBMCs, como esperado.

Quanto à expressão da β -actina, foi demonstrado na análise estatística diferença significativa referente a algumas amostras *outliers*. Esse resultado reforça a necessidade de utilização de no mínimo dois controles endógenos.

Figura 16: Valores de CTs dos genes endógenos da β -actina e do GAPDH.

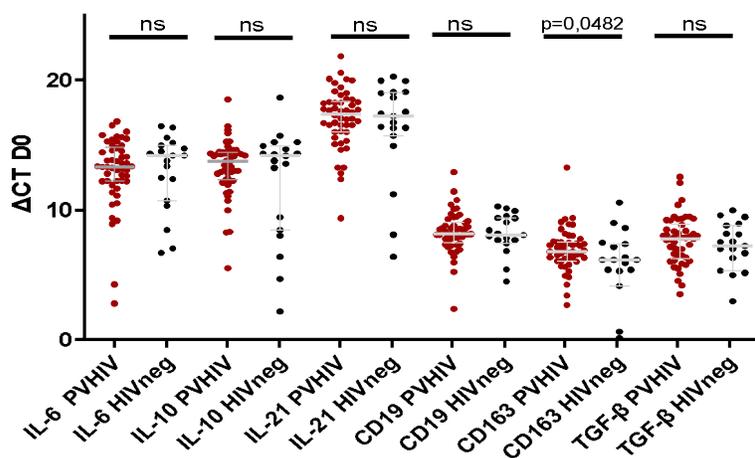


Representamos no eixo Y os valores de CT e no eixo X, os grupos do estudo por dia de análise. O teste aplicado foi de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

4.7 Comparação da expressão relativa das citocinas e receptores antes e depois da vacina

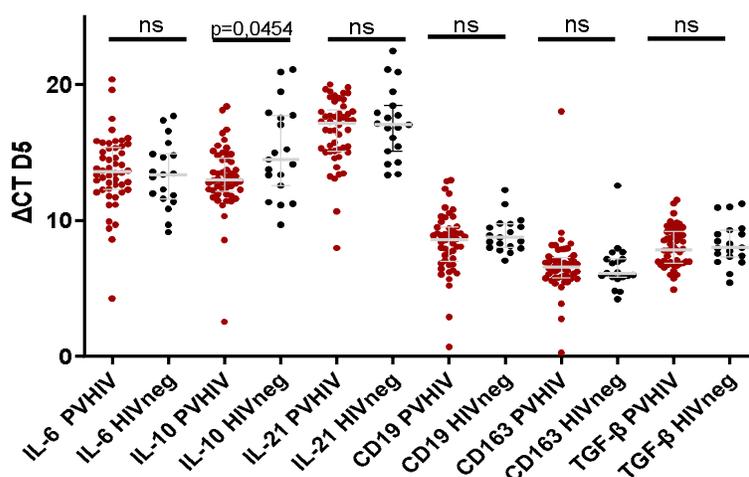
A partir do cálculo obtido através dos valores de CT dos alvos e dos genes endógenos utilizados, obtivemos os resultados de expressão relativa (Δ CT) dos indivíduos antes e depois da vacinação. A fim de verificar o perfil de expressão das citocinas e receptores antes da vacinação e entender como elas se apresentavam entre as PVHIV e o grupo controle, foram gerados os gráficos das figuras 17 e 18. Na figura 17, inserimos apenas os valores de D0 das PVHIV e dos indivíduos controle como mencionado no eixo X. Observamos que no momento que antecede a aplicação da vacina era observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos para o receptor CD163. A tabela os valores dos Δ CTs em D0 e em D5 está apresentada no apêndice 1 (figura suplementar 1).

Figura 17: Valores de expressão relativa antes da vacinação contra Febre Amarela. No eixo x, inserimos o grupo de análise e no eixo y apresentamos os valores de ΔCT .



A mesma análise foi realizada com as amostras coletadas cinco dias após a aplicação da vacina e nesse momento o único alvo em que foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) foi a citocina IL-10, como demonstrado na figura 18.

Figura 18: Valores de expressão relativa depois da vacinação contra febre amarela. No eixo x, inserimos o grupo de análise e no eixo y apresentamos os valores de ΔCT .

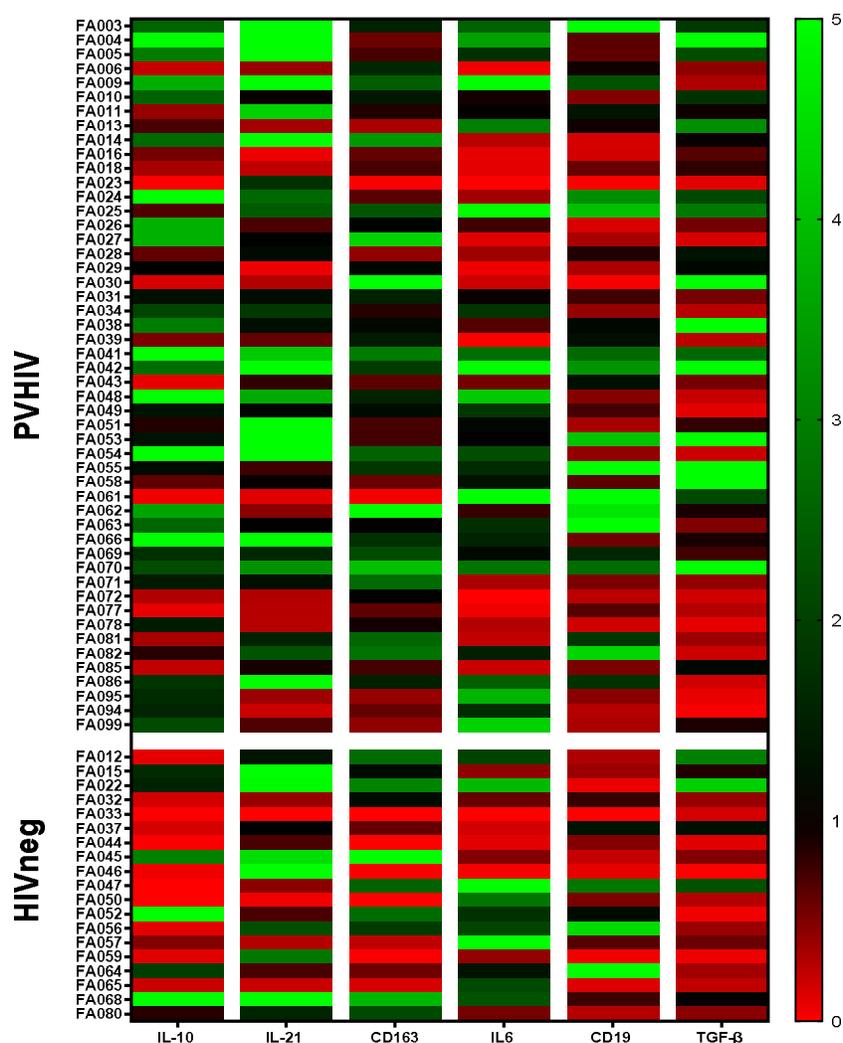


Os grupos com NS não apresentaram diferença estatística e neste caso, foi observada diferença significativa na expressão da citocina IL-10 com valor de $p = 0,0454$. Barras horizontais em rosa representam o intervalo interquartil e os valores de p foram corrigidos pelo número de comparações par a par pelo método Mann-Whitney.

4.8 Expressão diferencial das citocinas e receptores

A partir dos cálculos de *fold change* de cada indivíduo para cada alvo, ilustramos no mapa de calor abaixo aqueles que apresentaram a citocina/receptor expresso ou reprimido. Em vermelho, destacamos os indivíduos que apresentaram queda da expressão de determinado alvo no 5º dia após aplicação da vacina. Já aqueles em verde apresentaram aumento na expressão do gene alvo e os marcados em preto não apresentaram alteração. No mapa de calor, conseguimos observar que as amostras do grupo controle (HIVneg), demonstram tendência de queda na expressão dessas citocinas e receptores.

Figura 19: Mapa de calor do fold change das citocinas e receptores.



No lado esquerdo, destacamos os dois grupos de indivíduos e na parte inferior de cada coluna apresentamos o alvo. Valores em vermelho representam repressão do alvo (>1) e em verde, representamos aqueles que tiveram queda na expressão do alvo ($\text{fold change} < 1$) após a vacinação. Retângulos em preto demonstram aqueles indivíduos que não apresentaram alteração na expressão do alvo. Gráfico gerado pelo programa GraphPad Prism 9.

4.8 Avaliação da expressão diferencial das citocinas e receptores

Apresentamos na figura 20, os gráficos referentes a expressão diferencial dos seis alvos avaliados. Ao analisarmos os valores de expressão relativa da IL-6, observamos que 50,7% dos participantes apresentaram aumento no *fold change* (valores >1), enquanto 49,2% demonstraram valores de *fold change* abaixo de 1, classificados assim por apresentarem queda na expressão desse gene. Quando observamos apenas o grupo de PVHIV (n=50), verificamos que exatos 50% dos indivíduos apresentaram aumento do *fold change*, enquanto os outros 25 indivíduos demonstraram queda na expressão desta citocina. Observamos detalhadamente os dados demográficos destes dois grupos e constatamos que são homogêneos tanto na quantidade de participantes do sexo feminino e masculino, quanto na idade (ambos os grupos a média foi de 42 anos). Quando comparamos a expressão gênica diferencial nos nossos dois grupos de análise (Figura 20a), não verificamos diferença significativa entre os valores de *fold change*.

Em relação à expressão diferencial da IL-10, observamos que 52,1% dos participantes do nosso estudo apresentaram aumento na expressão dessa citocina enquanto 47,8% apresentaram queda nos valores de *fold change*. Considerando os valores de *fold change* apresentados pela IL-10, observamos de acordo com a figura 20b, que existe diferença significativa na sua expressão ($p= 0,0123$) entre o grupo PVHIV e o grupo controle. PVHIV apresentaram maiores valores de expressão da citocina IL-10 no quinto dia após a vacina enquanto os indivíduos controles, possuem menores valores de expressão desta citocina (Figura 20b).

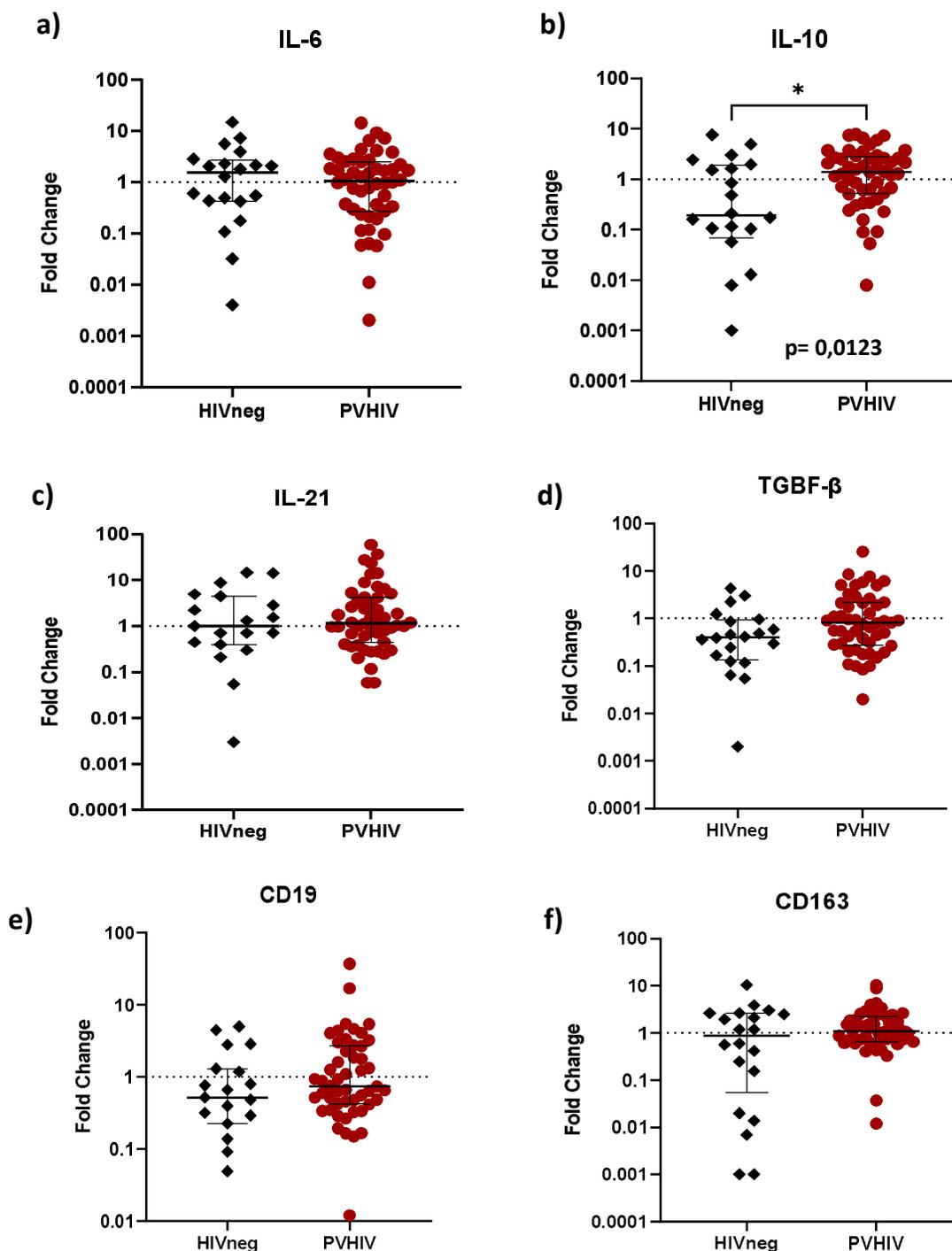
Quanto aos valores de *fold change* demonstrados pelos participantes para a citocina IL-21, observamos que, 55,07% apresentaram aumento da expressão (*fold change* >1), enquanto 44,9% demonstraram queda (<1). Como destacado na figura 20c, não foi verificada diferença significativa entre a expressão de IL-21 no grupo controle e em PVHIV.

Ao avaliarmos a expressão diferencial do TGF- β , observamos que 67% dos indivíduos demonstraram queda na expressão dessa citocina, enquanto 33% apresentaram aumento na expressão da mesma. Dos 20 participantes controles do estudo, 80% demonstraram valores de *fold change* menores que 1 para expressão do TGF- β , enquanto no grupo PVHIV, 62% também apresentaram queda na expressão. Não foi verificada diferença significativa na expressão do TGF- β entre os grupos controle e PVHIV.

Em relação a expressão do receptor CD19, 61% dos participantes demonstraram queda, enquanto 39% apresentaram aumento de *fold change*. Quanto ao comparativo da expressão desse receptor nos grupos PVHIV e controle (Figura 20e) não foi constatada diferença significativa. No grupo controle (n=20), 68,4% dos indivíduos obtiveram queda na expressão desse receptor.

Com relação a expressão do receptor CD163, verificamos que 55% dos participantes apresentaram aumento da expressão, enquanto 45% demonstraram queda. No entanto, quando esses valores de *fold change* foram submetidos ao teste estatístico e comparados entre os grupos controle e de PVHIV não foram verificadas diferenças significativas, conforme observamos na figura 20f.

Figura 20: Gráficos da Quantificação Relativa (log10) das amostras dos 70 indivíduos após a vacinação contra a Febre Amarela.



Apresentamos os resultados de expressão de todos os alvos e receptores com suas distribuições amostrais representadas na forma de dot-plots. Losangos indicam valores de fold change dos indivíduos do grupo controle (HIVneg) e círculos indicam indivíduos PVHIV. Barras horizontais pretas representam os intervalos interquartil dos efeitos marginais médios esperados por grupo. Os valores de p foram corrigidos pelo número de comparações dois-a-dois pelo método Mann-Whitney. Foram considerados significativos os valores: * $p < 0,05$. Figura (A): expressão gênica da IL-6, figura (B): expressão gênica IL-10 com p valor significativo, figura (C): expressão gênica da IL-21, figura (D): expressão gênica do TGF- β , figura (E): expressão gênica do CD19 e figura (F): expressão gênica do CD163.

Na tabela 8, inserimos as medianas dos valores da quantificação relativa de cada alvo de todos os indivíduos pertencentes a cada um dos dois grupos. Nesta análise, observamos que o receptor CD19 e o TGF- β e apresentaram as medianas abaixo de 1, demonstrando uma tendência de queda na expressão, cinco dias após a aplicação da vacina, tanto no grupo controle como no de PVHIV.

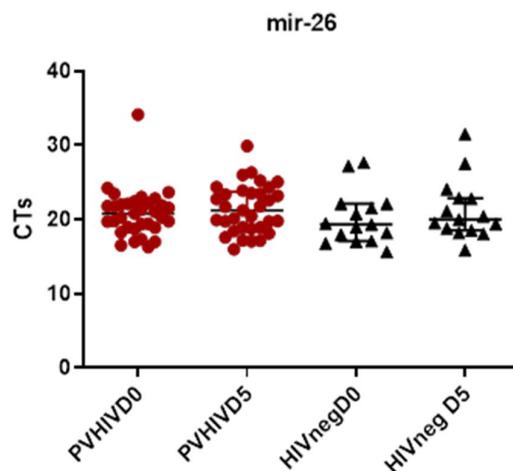
Tabela 8: Medianas dos valores da expressão diferencial de cada alvo.

Alvos	Fold- Change PVHIV	Fold- Change HIVneg	p valor
IL-6	1,051	1,529	0,5924
IL-10	1,416	0,191	0,0123
IL-21	1,165	1	0,6626
CD19	0,737	0,517	0,17
CD163	1,091	0,887	0,2994
TGF- β	0,808	0,402	0,0675

4.9. Estabilidade de expressão do gene endógeno mir-26a

Para dar início aos experimentos de expressão gênica dos miRNAs, quantificamos inicialmente duas amostras (D0 e D5) de um mesmo indivíduo a partir da extração com 2uL, 5uL e 10uL de RNA. Realizamos a síntese da molécula de cDNA a segundo orientações do fabricante e preparamos as diluições 1:10 em TE. Quanto a estabilidade do nosso gene endógeno, demonstramos na figura 22 no eixo Y, os valores de CT de todas as amostras que tiveram sua expressão gênica de miRNAs avaliadas. Quanto ao grupo controle, inserimos os valores de CT das 30 amostras (15 participantes em d0 e d5) observado nos triângulos pretos. Em vermelho, apresentamos os CTs das 66 amostras referentes ao grupo de PVHIV, 33 amostras no dia zero e 33 no dia cinco, totalizando assim 48 participantes em dois momentos (96 amostras). Observamos a expressão constitutiva do gene, definindo assim como nosso controle endógeno nas análises subsequentes.

Figura 21: Valores de CTs do gene endógeno mir-26a.



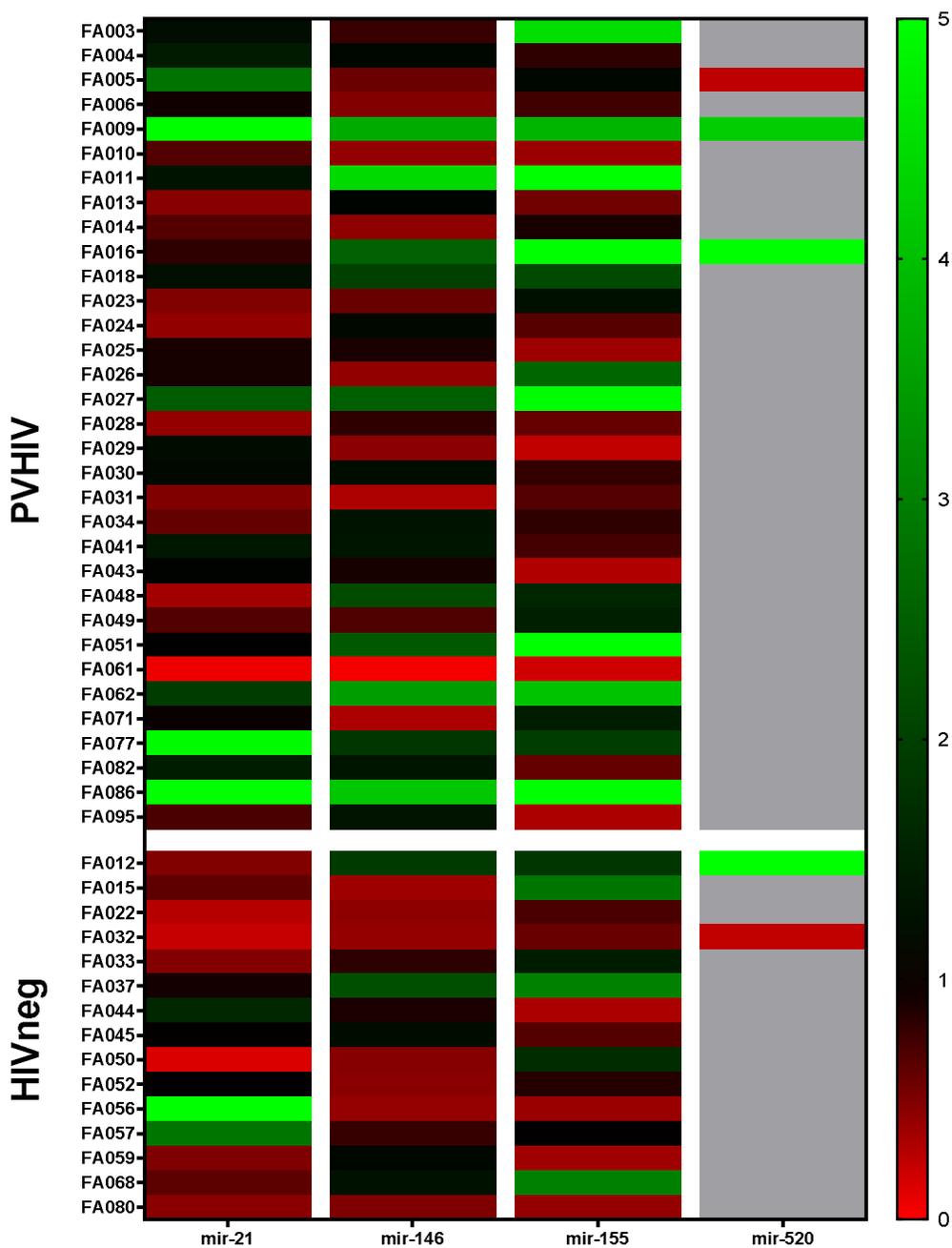
Representamos no eixo Y os valores de CT e no eixo X, os grupos do estudo por dia de análise. O teste aplicado foi de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

4.10 Expressão diferencial dos miRNAs

Das 140 amostras referentes aos 70 indivíduos avaliados no âmbito das citocinas, realizamos a expressão gênica de 96 amostras, representando 48 indivíduos. Destes 48, quinze pertencem ao grupo controle (HIVneg) e 33 ao grupo PVHIV.

No mapa de calor apresentado na figura 23, incluímos os valores de *fold change* de cada participante para os quatro miRNAs avaliados, separando por grupo. É possível observar uma tendência a repressão da expressão dos miRNAs cinco dias após a vacina, principalmente no grupo controle. Todos os miRNAs apresentaram valores calculáveis de *fold change*, porém não foi possível para o mir-520. Dos 48 indivíduos analisados, apenas seis apresentaram valores calculáveis de expressão diferencial a partir da amplificação do miRNA. Destes, três mostraram expressão do mir-520 e os outros três demonstraram o gene reprimido após a vacinação. As amostras que não apresentaram sinal de amplificação foram novamente testadas, mantendo o nível de expressão indetectável.

Figura 22: Mapa de calor do Fold Change dos miRNAs.



No lado esquerdo, destacamos os dois grupos de indivíduos e na parte inferior de cada coluna apresentamos o alvo. Valores em vermelho representam repressão do alvo (>1) e em verde, representamos aqueles que tiveram queda na expressão do alvo (fold change <1) após a vacinação. Retângulos em preto demonstram aqueles indivíduos que não apresentaram alteração na expressão do alvo e aqueles em cinza correspondem as amostras que não amplificaram. Gráfico gerado pelo programa GraphPad Prism 9.

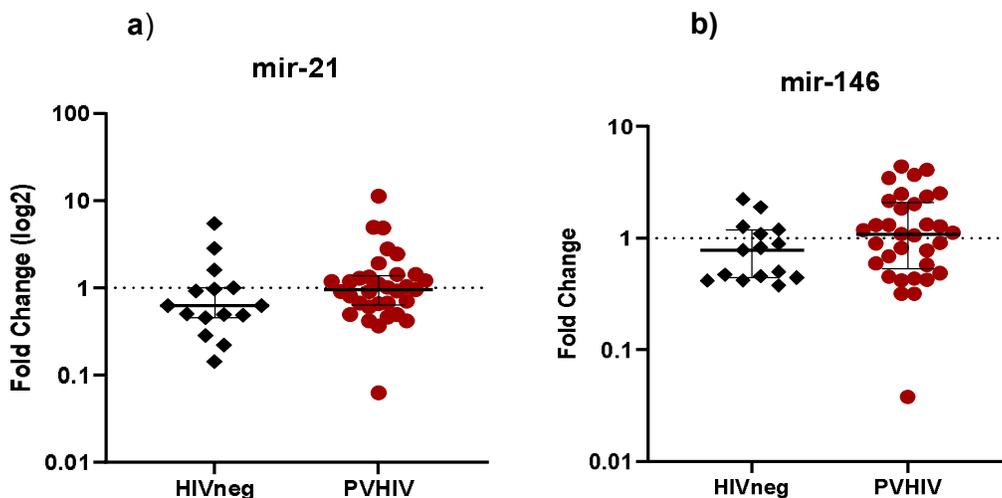
Quando avaliamos individualmente a expressão dos mirRNAs selecionados, observamos para o mir-21 que 28 (58%) dos 48 participantes mostraram valores de *fold change* <1, demonstrando queda na expressão, enquanto 20 (42%) apresentaram valores de *fold change* >1, indicando aumento da expressão deste miRNA. Na análise comparativa entre PVHIV e grupo controle (HIVneg), não é observada diferença estatística de expressão, apresentado na figura 23a.

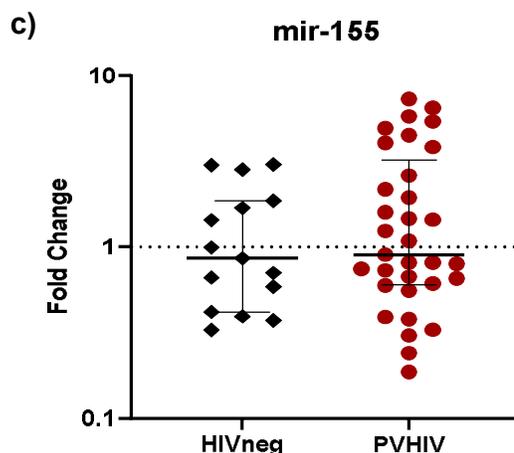
Quanto ao mir-146, dos 48 indivíduos testados, 25 (52%) apresentaram queda na expressão do mir-146, enquanto 23 (48%) demonstraram aumento. Nos 15 indivíduos do grupo controle, dez (66,6%) apresentaram queda na expressão do mir-146 cinco dias após aplicação da vacina. Quando comparamos grupos PVHIV e controle, não foi verificada diferença estatística.

Em relação a expressão do mir-155, 26 participantes (54%) obtiveram queda na expressão do miRNA, enquanto 22 (46%) apresentaram valores de *fold change* maiores do que um. Nove (60%) dos 15 participantes do grupo HIVneg, demonstram queda na expressão do miRNA, porém não é observada diferença estatística na expressão diferencial entre esse grupo e o PVHIV.

Na figura 23, inserimos os três gráficos com os valores de *fold change* referentes ao mir-21, mir-146 e mi155. Inserimos uma linha pontilhada cortando o gráfico no valor de 1, para melhor visualização das amostras que apresentaram expressão aumentada ou diminuída.

Figura 23: Gráfico da Quantificação Relativa (log10) das amostras dos 48 indivíduos após a vacinação contra a Febre Amarela





Apresentamos os resultados de expressão dos alvos mir-21 (a), mir-146(b) e mir-155 (c) com suas distribuições amostrais representadas na forma de dot-plots. O eixo X em azul representa os dois grupos (em azul grupo controle (HIVneg) e em rosa PVHIV). O fold change está descrito no eixo Y, em escala logarítmica de base 10. Losangos indicam valores de fold change dos indivíduos HIVneg e círculos indicam indivíduos PVHIV. Barras horizontais pretas representam os intervalos de confiança de 95% dos efeitos marginais médios esperados por grupo. Os valores de p foram corrigidos pelo número de comparações dois-a-dois pelo método Mann-Whitney. Foram considerados significativos os valores: * $p < 0,05$.

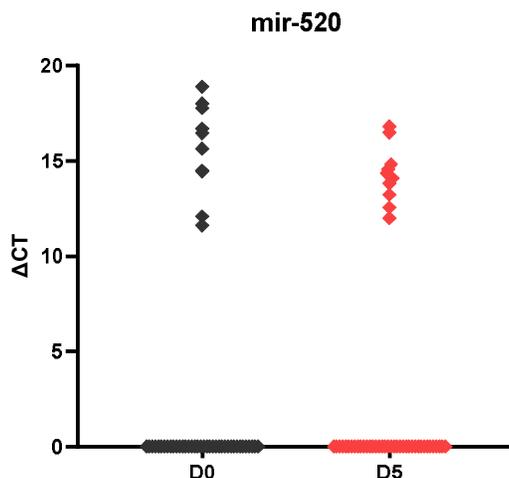
Diferentemente dos outros miRNAs avaliados até o presente momento, o mir-520 demonstrou não ser expresso na grande maioria dos 48 indivíduos testados. Apenas cinco participantes apresentaram valores de *fold change* calculáveis (quando conseguimos à amplificação do alvo no D0 e no D5). Destes cinco, três são PVHIV e dois pertencentes ao grupo HIVneg. Dos três indivíduos do grupo PVHIV, dois apresentaram expressão aumentada do mir-520 e um apresentou queda na expressão. No grupo controle, um participante apresentou aumento e outro apresentou queda na expressão deste miRNA.

Como já mencionado, a amplificação do mir-520 não manteve um padrão de expressão para todas as amostras. Dez dos 48 (20%) indivíduos demonstraram a expressão dessa citocina apenas do D0, enquanto outros 20% (apenas cinco em comum referentes aqueles que conseguimos calcular o *fold change*) apresentam amplificação apenas no D5.

Para melhor visualização desse resultado, criamos um gráfico com os valores de ΔCT (CT alvo - CT do gene endógeno) desses indivíduos. Na figura 24, losangos em cinza representam os valores de ΔCT dos dez participantes no D0 e os losangos rosas são referentes aos indivíduos que apresentaram amplificação no D5.

Conseguimos observar no gráfico que a grande maioria das amostras possui o valor de zero indicando a ausência de amplificação desse alvo.

Figura 24: Gráfico com o Δ CT das amostras dos 48 indivíduos após a vacinação contra a Febre Amarela.



Apresentamos os resultados do Δ CT do alvo mir-520 com suas distribuições amostrais representadas na forma de dot-plots. Losangos em cinza indicam o Δ CT dos indivíduos HIVneg e losangos em rosa indicam o Δ CT das PVHIV. Barras horizontais pretas representam os intervalos de confiança de 95% dos efeitos marginais médios esperados por grupo. Os valores de p foram corrigidos pelo número de comparações dois-a-dois pelo método Mann-Whitney. Foram considerados significativos os valores: * $p < 0,05$.

Na tabela 9, inserimos as medianas dos valores da expressão diferencial de cada alvo em todos os indivíduos pertencentes a cada um dos dois grupos. Nesta análise, apesar de não ter sido demonstrada diferença significativa de *fold change* nos alvos de miRNA testados, podemos observar que houve uma tendência aumentada em todos esses alvos nos PVHIV.

Tabela 9: Mediana dos valores de *fold change* de cada alvo.

Alvos	Fold- Change PVHIV	Fold- Change HIVneg	p valor
mir-21	0,956	0,625	0,127
mir-146	1,086	0,785	0,1374
mir-155	0,901	0,858	0,5231

Avaliamos também a expressão relativa separadamente para cada miRNA nos grupos PVHIV e controle nos dias zero e cinco. Os gráficos estão apresentados no

apêndice I (Figura suplementar 1). Observamos que os valores de ΔCT do mir-155, foram mais elevados nos dias zero e cinco do que o mir-21 e mir-146.

4.11 Correlação entre a expressão dos miRNAs com as citocinas e receptores

Nessa análise, buscamos correlacionar a expressão diferencial dos miRNAs analisados com as citocinas e receptores que conforme verificado na literatura, já haviam sido relacionados. Verificamos também a associação prévia através do banco de dados mirbase (<https://www.mirbase.org/>).

Nesta, o intuito foi verificar se os resultados eram inversamente proporcionais, ou seja, se a expressão aumentada de um determinado miRNA, estaria por exemplo, inibindo a expressão do alvo. Como possuímos os resultados de expressão gênica dos miRNAs de 48 indivíduos, selecionamos os valores de *fold change* desses mesmos participantes realizamos os gráficos.

Correlacionamos o *fold change* do mir-146 com o *fold change* das citocinas IL-6 e TGF- β e não observamos linearidade dos pontos na curva, conforme figura 25a e 25b. Assim, não há indício de algum tipo de correlação entre esse miRNA com essas citocinas.

Através dos valores de *fold change* do mir-21, repetimos a análise com as citocinas TGF- β e IL-10 e a mesma ausência de correlação foi verificada (Figura 25c e 25d).

O mir-155 foi correlacionado com o TGF- β e a IL-10 e com o receptor CD19. Em nenhuma das comparações há um indício de correlação entre expressão de miRNA/inibição de citocina.

Os indivíduos com valores de *fold change* considerados outliers foram repetidos na PCR em tempo real e esse perfil se manteve.

Figura 25: Análise de *Correlação de Pearson* entre os valores de *fold change* dos *miRNAs* avaliados e dos respectivos *alvos*.

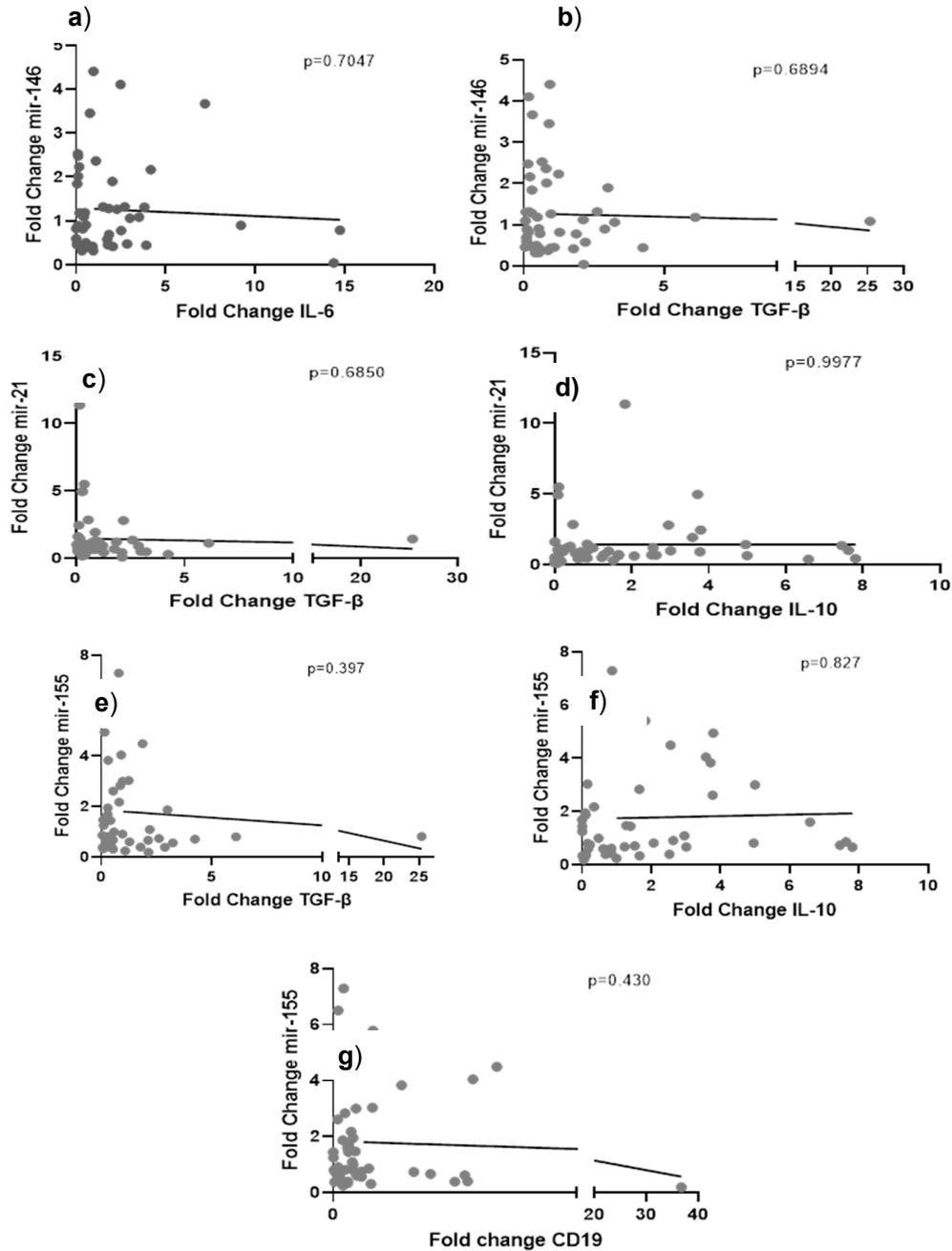


Figura (A): correlação do *fold change* do mir-146 com a citocina IL-6, figura (B): correlação do *fold change* do mir-146 com a citocina TGF- β : figura (C): correlação do *fold change* do mir-21 com a citocina TGF- β , figura (D): correlação do *fold change* do mir-21 com a citocina IL-10, figura (E): correlação do *fold change* do mir-155 com citocina TGF- β , figura (F): correlação do *fold change* do mir-155 com a citocina IL-10, figura (G): correlação do *fold change* do mir-155 com o receptor CD19. *não foi observado *p* valor significativo (<0,05).

5. Discussão

De acordo com a atualização epidemiológica da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS 2018), cinco países das Américas notificaram casos confirmados de febre amarela: Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa e Peru. Considerando que a febre amarela é uma doença viral transmitida por mosquitos infectados, que pode levar ao óbito, existe um incentivo para que todos os locais pertencentes a áreas de risco de transmissão continuem imunizando a população e mantendo os viajantes informados sobre a necessidade da vacinação. A vacina contra a febre amarela reproduz uma infecção viral aguda e induz uma potente resposta imunológica celular e humoral e de longa duração (PULENDRAN et al., 2013). Devido ao fato de que as áreas endêmicas para febre amarela são, em muitos casos, sobrepostas àquelas com elevada prevalência de HIV-1, existe a necessidade de entender melhor a resposta imunológica desses indivíduos frente à vacinação.

Apesar de serem poucos dados sobre a segurança e eficácia da vacina contra febre amarela em PVHIV, as recomendações recentes afirmam que esses indivíduos quando apresentam contagens de células CD4⁺ maiores que 200 células/mm³ devem ser imunizados (Nota Informativa nº 01, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017).

Uma das principais características da infecção pelo HIV-1 é a depleção das células TCD4⁺. Essa perda foi vista inicialmente como um processo gradativo que resultava no surgimento da aids em indivíduos infectados pelo HIV-1 e na ausência da terapia (PANTALEO; FAUCI, 1995). Em nossa análise do perfil do *status* imunológico em relação a perda/ganho de células TCD4⁺, cinco dias após a vacinação dos participantes do estudo, verificamos que os indivíduos do grupo controle e as PVHIV apresentaram uma queda acentuada de linfócitos TCD4⁺ no quinto dia, o que possivelmente está associado ao pico de carga viral vacinal.

Um estudo de Reinhardt et al., 1998 observou que após aplicação da vacina 17D-204, os linfócitos TCD4⁺ inicialmente diminuíram nos primeiros sete dias, corroborando com a nossa observação (KOHLENER et al., 2012; REINHARDT et al., 1998) onde verificamos queda nessa população no 5º dia.

Quanto aos títulos de anticorpos neutralizantes, observamos em nosso estudo que 100% dos indivíduos desenvolveram uma resposta humoral com títulos acima de 100, independente do ganho ou perda de células TCD4⁺ ou do *status* sorológico para a infecção pelo HIV-1, reforçando a elevada imunogenicidade já descrita para a vacina (COLIN DE VERDIERE et al., 2018). Em um estudo de Avelino-Silva e colaboradores

(2016), foi verificado em uma coorte de indivíduos que receberam a vacina da febre amarela (N= 57), e aqueles que viviam com HIV-1 (N= 12) apresentaram imunogenicidade inicial semelhante aos indivíduos sem a infecção. Porém, quando avaliados um ano após a vacinação, foi verificada menor persistência desses anticorpos neutralizantes específicos para o vírus da febre amarela na coorte de PVHIV.

Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA publicaram recomendações sugerindo que indivíduos vivendo com HIV-1 possam se beneficiar de uma vacinação de reforço, o que não seria recomendado em circunstâncias de rotina devido à alta imunogenicidade e durabilidade de vírus da febre amarela na população em geral (STAPLES et al., 2015). O mesmo grupo sugeriu que um reforço pode ser benéfico até mesmo para pessoas vivendo com HIV-1 com contagens altas de células TCD4⁺, uma vez que a menor persistência de anticorpos neutralizantes foi observada um ano após a vacinação, e surgimento de efeitos adversos após a dose de reforço são raros (DE MENEZES MARTINS; FERNANDES LEAL; HOMMA, 2015; LINDSEY et al., 2016). A formação de uma resposta de células TCD4⁺ de memória eficaz é muito importante e depende de estímulos de citocinas para conservar os títulos de anticorpos neutralizantes altos (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014). Com isso, confirmamos a necessidade de mais estudos que acompanhem e determinem a durabilidade da imunogenicidade após a vacinação nesta população.

O evento inicial da interação entre as proteínas virais, conduzem à síntese e à liberação de uma variedade de mediadores imunológicas, os quais incluem citocinas e quimiocinas. A caracterização da expressão de citocinas é uma abordagem que revela o envolvimento destas no processo imunológico que pode ser melhor compreendido, a fim de identificar características de um bom funcionamento auxiliando nos correlatos de proteção e possibilitando possíveis terapias de ajustes nos casos de falha imunológica.

Embora a viremia nas PVHIV, seja efetivamente suprimida e os números de células TCD4⁺ periféricas se recuperem para níveis quase saudáveis após a terapia antirretroviral, algumas das consequências disfuncionais da infecção pelo HIV-1 continuam a persistir a despeito da terapia. Nesse contexto, buscamos avaliar a expressão dos genes das citocinas IL-6, IL-10, IL-21, TGF- β e receptores CD163, CD19 anterior a vacinação e no quinto dia após, em 50 indivíduos vivendo com HIV-1 e 20 indivíduos sem infecção pelo HIV-1 (grupo controle). A mesma metodologia foi

utilizada para avaliação da expressão do: mir-21, mir-146, mir-155 e mir-520, no entanto com um número amostral reduzido.

A IL-6 promove a diferenciação específica de células TCD4⁺ *naïve*, desempenhando uma função importante na ligação da resposta imunológica inata à adquirida. No presente estudo, quando avaliamos a expressão gênica diferencial da IL-6, observamos que esta expressão se apresentou de forma homogênea entre os grupos avaliados. Foi demonstrado que a IL-6, combinada com TGF- β , é indispensável para a diferenciação das células Th17 de células TCD4⁺ *naïve* (KORN et al., 2009). Contudo, não observamos associações significativas na expressão da IL-6 entre PVHIV em terapia antirretroviral e o grupo controle após a aplicação da vacina, demonstrando que as PVHIV não possuíram alteração na produção desta citocina frente a vacina 17DD, e que a expressão IL-6 se mostrou homogênea entre os participantes do estudo. Alguns estudos avaliaram a resposta imunológica contra a FA e mostraram um aumento significativo nos níveis de citocinas, como interferon- α e β , e TNF após a vacinação, e um pico de IL-6, cinco dias após, indicando seu papel potencial em prever a proteção induzida pela vacina. (HACKER et al., 1988; REINHARDT et al., 1998), porém em nosso estudo não foi observada uma expressão gênica aumentada.

Em nosso estudo, não foram identificados casos de eventos adversos após a imunização entre os participantes. No estudo prévio realizado por Fradico e colaboradores (2021), a IL-6 foi associada a 28 casos suspeitos de eventos adversos pós a vacinação contra a febre amarela (FRADICO et al., 2021), onde demonstraram que além da IL-6 os níveis de citocinas encontrados aumentados foram de CXCL8, CCL2, CXCL10, IL-1 β e TNF- α .

Amado e colaboradores descreveram que diversas citocinas podem ser reguladas por miRNAs em linfócitos T, desempenhando um papel importante para a maturação e funções reguladoras imunológicas destas células (AMADO et al., 2015). O controle da expressão gênica no nível da tradução do mRNA é uma etapa crucial que regula a função adequada dos principais processos celulares, como proliferação celular, diferenciação, apoptose e tumorigênese. Desta forma, os miRNAs circulantes poderiam ser utilizados como biomarcadores em uma gama de doenças e de respostas imunológicas, fato esse que vem sendo fortemente explorado (DUMORTIER; HINAULT; VAN OBBERGHEN, 2013).

Estudos recentes mostraram que o mir-155 e o mir-146 têm funções críticas na regulação de respostas inflamatórias em macrófagos e monócitos (HOU et al., 2009; O'CONNELL; RAO; BALTIMORE, 2012). Foi observado que o mir-146a suprime a transcrição de IL-6 tendo como alvo a quinase 1 associada ao receptor de IL-1 (ZILAHÍ et al., 2012). Contudo, observamos que a expressão do mir-146 não apresentou diferença significativa após a vacinação, assim como a IL-6, como demonstrado nas análises de correlação entre o mir-146 e a IL-6.

A IL-10 é uma citocina que neutraliza as respostas imunológicas inflamatórias excessivas (MOORE et al., 2001). Produzida por vários tipos de células, ela exerce seu efeito antiinflamatório limitando a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Os níveis plasmáticos de IL-10 estão aumentados em indivíduos com infecção pelo HIV-1 e contribuem diretamente para a resposta anormal das células T citotóxicas frente a infecção (BROCKMAN et al., 2009). A produção de citocinas é iniciada entre os dias cinco e sete pós-vacinação com a vacina 17DD, porém é IL-10 demonstra um aumento no início do dia 3 (FERREIRA et al., 2018). Os níveis de IL-10 aumentados durante o pico de viremia podem permitir o desenvolvimento e maturação de células apresentadoras de antígeno (CAMPI-AZEVEDO et al., 2012). A regulação pós-transcricional de IL-10 por miRNA pode ser relevante em inúmeras doenças. A família let-7 (inclui doze miRNAs homólogos em humanos inseridos no grupo de miRNAs supressores tumorais) (IORIO et al., 2005) também pode regular diretamente a IL-10 (SWAMINATHAN et al., 2012). Indivíduos que vivem com o HIV-1 possuem níveis significativamente reduzidos de miRNAs da família let-7, resultando em um aumento na produção de IL-10 a partir de células TCD4⁺ [REF]. Essas informações corroboram com o que apresentamos nos nossos resultados quando observamos que o grupo PVHIV apresentou a expressão diferencial de IL-10 aumentada ($p=0,0123$) comparado aos controles saudáveis. Em adição, quando avaliamos apenas o Δ CT (a expressão relativa) da IL-10 dos participantes no dia cinco, também observamos maior expressão dessa citocina nos indivíduos que com infecção pelo HIV-1. Embora, uma das suposições da diminuição de linfócitos TCD4⁺, na circulação periférica seja a migração destes para os linfonodos, especula-se também a interferência desta citocina, uma vez que níveis aumentados de IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e a proliferação de linfócitos T, segundo (DE WAAL MALEFYT et al., 1991).

Bento e colaboradores em 2009, demonstraram com amostras de 62 gestantes vivendo com HIV-1, altos níveis de secreção de IL-10 que foram claramente relacionadas a baixa replicação do HIV-1 nesta população. Os autores demonstraram ainda que o uso da terapia antirretroviral em gestantes levaria a um aumento nos níveis séricos de IL-10 e que estes níveis estão inversamente relacionados ao risco de transmissão vertical (BENTO et al., 2009). Esse dado também está de acordo com nossas observações de expressão aumentada da IL-10 em PVHIV, visto que os participantes fazem uso da terapia antirretroviral desde o momento do diagnóstico.

Um estudo destacou um novo mecanismo de regulação do miR-155, os autores demonstraram que a IL-10 pode inibir a expressão de miR-155, em contrapartida, esse efeito não foi observado em relação ao miR-21 (MCCOY et al., 2010). Esse foi o primeiro exemplo da IL-10 desempenhando um papel na função de miRNAs. Eles também verificaram que expressão do miR-155 foi duplicada em resposta ao lipopolissacarídeo em células deficientes em IL-10, demonstrando que a IL-10 pode realimentar o sistema para manter a expressão de miR-155 sob controle, destacando um mecanismo adicional de controle de IL-10 no resposta pró-inflamatória (MCCOY et al., 2010). Quando correlacionamos os nossos resultados de *fold change* do mir-155 com a IL-10, não verificamos qualquer tipo de correlação estatística entre eles. Assim como o estudo citado acima, também não verificamos correlação na expressão do mir-21 e da IL-10.

Os mecanismos de *feedback* de miRNAs mediados pela regulação pós-transcricional de IL-10, podem ser críticos na manutenção da homeostase imunológica, e sua desregulação pode levar à doença. Sharma e colaboradores, demonstram que é muito provável que o controle pós-transcricional mediado pelo miR-106a possa estar potencialmente envolvido nos níveis de expressão de IL-10 ditando e geração de uma resposta imunológica a um estímulo externo específico (SHARMA et al., 2009). Pode-se dizer que a regulação pós-transcricional da IL-10 é um assunto de interesse clínico devido ao seu papel crucial de modulador da inflamação.

A IL-21 apresentou um aumento na sua expressão diferencial em 55% dos indivíduos analisados, esta, possui influência imunomoduladora sobre o sistema imunológico inato e adaptativo, particularmente em relação a infecção pelo HIV-1, e tem sido associada à geração de células T CD8⁺ de memória específicas para o vírus e limitação da exaustão de células TCD8⁺ em infecções virais (NOVY et al., 2011). As células TCD8⁺ específicas para HIV-1 secretoras de IL-21 também parecem ser

preferencialmente enriquecidas em controladores de elite, que são indivíduos que controlam a viremia sem a terapia antirretroviral. Em adição, a IL-21 foi inversamente associada à progressão da doença e maior supressão viral em resposta à terapia antirretroviral (MF CHEVALIER, 2001) apresentando queda dos seus níveis de expressão devido à grave depleção das células TCD4⁺ (YI; DU; ZAJAC, 2009). Portanto, esperávamos observar uma expressão desta citocina aumentada significativamente em relação aos indivíduos sem a infecção pelo HIV-1, porém não foi possível essa afirmação, pois as medianas de *fold change* foram muito similares entre os dois grupos. Contudo, mesmo com a ausência de significância estatística, observamos que dentre os 50 indivíduos do grupo PVHIV, 58% apresentaram aumento na sua expressão, enquanto no grupo controle, verificamos aumento na expressão da IL-21 em apenas 47%.

Nossos dados indicam uma queda no 5º dia após a vacina na expressão do TGF- β , citocina multifuncional responsável por inúmeras funções em diferentes tipos celulares (BARNARD; LY ONS; MOSES, 1990). São poucos dados disponíveis na literatura sobre a caracterização da expressão de citocinas no contexto vacinal e nenhum estudo relacionando a mecanismos de regulação das citocinas pró-inflamatórias em PVHIV vacinadas. Com as observações realizadas em nosso estudo, a expressão do TGF- β se manteve diminuída em todos os momentos. Dos 50 participantes vivendo com HIV-1, 62% demonstraram diminuição de expressão enquanto dos 20 indivíduos controle, 79% também demonstraram queda na expressão do TGF- β após aplicação da vacina.

É descrito, que miRNAs, produzidos no sistema nervoso central, tais como mir-155 e o mir-146a, notavelmente afetam respostas imunológicas frente a infecção com flavivírus, reduzindo a expressão de citocinas (PAREEK et al., 2014). Foi demonstrado que o miR-155 está diretamente envolvido na regulação de mais de 30 genes do sistema imunológico inato (GANTIER, 2010) e o miR-146a parece desempenhar vários papéis em termos de regulação de diferentes fenótipos, além de se mostrar um mediador importante de TGF- β . Os mir-146 e mir-155 têm sido relacionados negativamente com a regulação da resposta inflamatória aguda, através da modulação negativa de proteínas envolvidas nas vias de sinalização dos seus receptores (LINDSAY, 2008). Em outro estudo foi visto que o aumento da expressão do miR-21 levou a uma redução nos níveis de TGF- β 1 em *in vitro* e em PBMCs (BAI et al., 2015). Em nossos resultados de correlação entre a expressão de TGF- β com

o mir-155, mir 146 e mir-21 não foi encontrada correlação estatística de significância nessas expressões pós aplicação da vacina.

Quanto a expressão do receptor CD19 (expresso em todas as células da linhagem B), verificamos que 61% do total dos participantes demonstraram queda na expressão desse receptor no quinto dia após vacinação. O estudo de Martins e colaboradores (MARTINS et al., 2007), mensurou os níveis de CD19⁺ e também verificou decréscimo no sétimo dia após a vacinação da febre amarela em 50 voluntários não portadores do HIV-1. O papel de vários miRNAs individuais expressos na linhagem de células B foi estudado usando diferentes abordagens genéticas de ganho e perda de função *em modelos in vitro e in vivo*.

Um dos miRNAs mais extensivamente estudados em células B maduras é o miR-155. O miR-155 surgiu como um miRNA fundamental no sistema hematopoiético e tem um impacto significativo na biologia de várias células imunológicas, incluindo linfócitos B e T, monócitos, células dendríticas e células NK (RODRIGUEZ et al., 2007), e também desempenha um papel oncogênico em algumas dessas linhagens. Em nossa análise de correlação, não foi observada relação estatisticamente significativa entre a expressão do mir-155 e do receptor CD19.

Foi observado por da Silva e colaboradores (2015), em 20 voluntários saudáveis, através de citometria de fluxo e no contexto da vacinação contra Influenza A, que a vacina promoveu a elevação da frequência de células B totais, já no primeiro dia após a vacinação, sendo detectada também a presença do CD19 no sétimo dia. Também foi demonstrado uma produção contínua de IL-10 no grupo que recebeu a vacina em todos os momentos avaliados, e que esta citocina foi proveniente de diferentes fontes celulares, tais como o CD19 (SARAH GIAROLA DA SILVA, 2015). Como já mencionado, a IL-10 é um potente fator na proliferação e maturação de células B, bem como um componente crucial na produção de IgG1 e IgG3 por estas células, quando ativadas por CD40 (FLORENCE M et al., 1996).

O CD163 é um receptor presente em monócitos e macrófagos ativados e desempenha papéis funcionais importantes durante a inflamação (YANG et al., 2016) mediando diretamente algumas funções anti-inflamatórias e induzindo a produção de IL-10 (PHILIPPIDIS et al., 2004). Em uma análise preliminar, observamos que este receptor estava em média aumentado no dia zero (antes da aplicação da vacina) apresentando um Δ CT menor no grupo controle quando comparado ao grupo PVHIV. A expressão do receptor CD163 vem sendo estudada em células humanas (VAN DEN

HEUVEL et al., 1999, p. 163) e sua expressão é limitada às células da linhagem monocítica. Os macrófagos teciduais expressam altos níveis de CD163, o que pode estar relacionado ao papel importante na resposta à inflamação. Este receptor também está associado à diferenciação dos macrófagos, assim como em monócitos do sangue periférico, células Kupffer (no fígado) no baço e macrófagos maduros residentes da medula óssea (VAN DEN HEUVEL et al., 1999). Dos 70 indivíduos avaliados ao longo desse trabalho, 55% demonstraram um aumento na expressão gênica do receptor CD163 após a aplicação da vacina. Foi descrito por DE MOURA, um aumento na expressão gênica de CD163 e IL-10 em indivíduos com hanseníase (DE MOURA, STAPLES., 2015). Também foi demonstrado por SULAHIAN e colaboradores (2004) que a IL-10 aumenta diretamente a expressão gênica de CD163 em condições de anemia hemolítica autoimunológica ou infecções por bactérias, contudo não verificamos essa sinergia em nosso estudo (SULAHIAN et al., 2004).

DO e colaboradores em 2018, identificaram uma rede de miRNAs em monócitos que estão aumentados na artrite idiopática juvenil sistêmica, regulando a expressão de CD163 e as funções anti-inflamatórias. Também foi demonstrado que o miR-125a-5p funciona indiretamente para mediar mudanças amplas nos fenótipos de macrófagos por meio dos efeitos dos receptores de citocinas e das vias de sinalização intracelular e, em particular, a responsividade à IL-10 (DO et al., 2018).

Após obtermos os resultados de expressão gênica das citocinas, receptores e miRNAs, procuramos buscar a correlação entre essas expressões como previamente verificado na literatura. Neste trabalho não foi possível inferir que algum miRNA esteve interferindo no silenciamento de alguma citocina, mesmo sabendo que esses miRNAs regulam em média 50%, dos genes expressos no genoma humano, e um mesmo miRNA pode regular múltiplos transcritos (IORIO; CROCE, 2012).

Uma dificuldade do nosso estudo, foi à amplificação do alvo mir-520. Em uma análise de *microarray* foi revelado que o miR-520 regula a expressão de muitos genes relacionados à tradução, proliferação celular e câncer (MAZAN-MAMCZARZ et al., 2014). Em outro estudo de REN e colaboradores (2009), foi confirmado que maioria dos genes de miRNA em células tronco embrionárias humanas demonstraram a regulação positiva do miR-520. Também foi relatado que o miR-520 é altamente expresso em células-tronco hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical humano e promove a diferenciação destas células em células progenitoras (REN et al., 2009). Em nosso estudo, avaliando a expressão desse miRNA em PBMCs, verificamos que

apenas 12% dos indivíduos foram capazes de expressar o mir-520. Em uma análise individual a nível de participante observamos no mapa de calor que representa os *fold changes* dos miRNAs, que um indivíduo apresentou expressão de todos os miRNAs (inclusive o mir-520) e outro participante demonstrou queda na expressão de todos os miRNAs, incluindo o mir-520 que foi raramente constatado em nosso estudo. O indivíduo que demonstrou repressão na expressão desses miRNAs era um participante do grupo controle com todos os parâmetros clínicos e laboratoriais normais. Já o participante que obteve expressão aumentada, é portador do HIV-1 e quando observamos as informações em nosso banco de dados, observamos que ele apresentou as taxas de bilirrubina alteradas e d0 e d5 e leucocitose no dia 5.

Em nosso banco de dados, possuímos os resultados laboratoriais de cada indivíduo. Esses dados são uma ferramenta importante e essencial para o diagnóstico, acompanhamento e evolução, bem como para o prognóstico de qualquer patologia ativa ou não. É de extrema importância analisar esses exames de forma combinada para verificar alguma disfunção, uma vez que os hepatócitos são sítios de replicação do vírus da febre amarela e a vacina apresenta-se na forma de vírus atenuado (SIMON; HASHMI; TORP, 2020). Em quadros mais avançados de desordens, é verificado um aumento rápido das transaminases, em aproximadamente 48 a 72 horas, com predomínio de AST/TGO e bilirrubinas (HUANG et al., 2006). Esses dados foram levados em consideração para avaliação das análises principalmente quando um participante demonstrava um perfil muito diferente dos outros.

A avaliação de citocinas tornou-se um componente importante no estudo das doenças inflamatórias, infecciosas e neoplásicas. A identificação da transcrição de citocinas é uma abordagem que revela o envolvimento destas no processo imunológico. O controle de infecções imunopreveníveis, ou até mesmo a erradicação, necessita de uma cobertura vacinal ampla seguida da indução de imunidade protetora em uma parcela suficiente da população, para que assim ocorra a diminuição da circulação do patógeno. As vacinas induzem a produção de anticorpos neutralizantes e conferem proteção que se manifesta como uma resposta celular forte e polifuncional com potencial de amplificação. A manutenção desse controle, entre outros fatores, depende da permanência dessa imunidade em longo prazo.

Diante das informações que buscamos, este é o primeiro estudo que liga a vacinação contra FA com a expressão dos miRNAs e citocinas em PVHIV. Ainda são necessários outros estudos para melhor compreender como a regulação de miRNA

afeta a produção de citocinas e se essa regulação seria afetada após a exposição à vacina no contexto de indivíduos imunossuprimidos e saudáveis.

A ausência de diferenças significativas entre os grupos PVHIV e controle (com exceção da IL-10), podem resultar da eficácia da terapia antirretroviral nesses indivíduos, tornando-os praticamente um grupo único e homogêneo devido a restauração da resposta imunológica dos indivíduos tratados.

6. Conclusões

- Tanto PHVIH quanto os indivíduos do grupo controle, demonstram uma queda acentuada de linfócitos TCD4⁺ no quinto dia após aplicação da vacina da febre amarela.
- A vacina 17DD foi altamente imunogênica, todos participantes vacinados apresentaram títulos de neutralização considerados protetores 30 dias após a vacinação.
- O declínio de CD4⁺ verificado após a vacinação não impactou na capacidade de produção de anticorpos neutralizantes no dia 30.
- O receptor CD163 apresentou uma menor expressão em PVHIV antes da vacinação comparado ao grupo controle ($p=0,0482$), no entanto não observamos diferença estatística na expressão diferencial (D5-D0). Dessa forma, inferimos que a vacina possa ter induzido um aumento de expressão em PVHIV que se equiparou ao grupo controle.
- As citocinas IL-6 e IL-21 não tiveram sua expressão gênica alterada, indicando a ausência de possível estímulo induzido pela vacina da febre amarela.
- A associação dos resultados demonstra que a vacina induziu o aumento da expressão gênica de IL-10 em PVHIV em relação ao grupo controle.
- Os alvos CD19 e TGF- β demonstram uma tendência de queda (*fold changes* negativos) na expressão diferencial nos PVHIV e nos indivíduos do grupo controle após vacinação contra febre amarela.
- Os miRNAs: mir-21, mir-146 e mir-155 não apresentaram diferença estatística na sua expressão entre os grupos controle e PVHIV e apresentaram uma tendência a menor expressão após a vacinação.
- O mir-520 só apresentou detecção da expressão gênica para seis indivíduos, tornando inviável as análises de expressão diferencial desse alvo.
- Não foi possível determinar biomarcadores baseados na expressão dos miRNAs relacionados aos alvos pois os achados não sugerem correlação entre a expressão diferencial das citocinas e a expressão diferencial dos possíveis miRNAs.

7. Perspectivas

- Ampliar o número de alvos de citocinas e receptores. Pretendemos realizar os ensaios de expressão gênica da quimiocina CCL4 e das citocinas IL-4, IL-18 e TNF- α ;
- Ampliar o número amostral de miRNAs envolvidas nesses alvos, como: mir-125, mir-29, mir-181, mir-9, mir223, mir326 e mir-197.
- Ampliar o número amostral para 100 participantes.

9. Referências

ABREU, F. V. S. DE et al. Haemagogus leucocelaenus and Haemagogus janthinomys are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016-2018. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 218–231, 2019.

APPAY, V.; SAUCE, D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 231–241, jan. 2008.

ASANGANI, I. A. et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 15, p. 2128–2136, 3 abr. 2008.

AVELINO-SILVA, V. I. et al. CD4/CD8 Ratio and KT Ratio Predict Yellow Fever Vaccine Immunogenicity in HIV-Infected Patients. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005219, 2016.

BAI, L. et al. MicroRNA-21 Regulates PI3K/Akt/mTOR Signaling by Targeting TGF β 1 during Skeletal Muscle Development in Pigs. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0119396, 7 maio 2015.

BALLARINO, M. et al. Coupled RNA Processing and Transcription of Intergenic Primary MicroRNAs. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 20, p. 5632–5638, out. 2009.

BARNETT, E. D. Yellow Fever: Epidemiology and Prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 6, p. 850–856, 15 mar. 2007.

BARTE, H.; HORVATH, T. H.; RUTHERFORD, G. W. Yellow fever vaccine for patients with HIV infection. In: THE COCHRANE COLLABORATION (Ed.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. CD010929.

BERGANTZ, L. et al. Interplay between Intrinsic and Innate Immunity during HIV Infection. **Cells**, v. 8, n. 8, 17 ago. 2019.

BLOBE, G. C.; SCHIEMANN, W. P.; LODISH, H. F. Role of transforming growth factor beta in human disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 18, p. 1350–1358, 4 maio 2000.

Boletim Epidemiológico de HIV/Aids 2019. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/boletim-epidemiologico-de-hiv-aids-2019>>. Acesso em: 14 abr. 2020.

BONALDO, M. C. et al. Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. **Journal of Molecular Biology**, 25 jan. 2002.

BONALDO, M. C.; SEQUEIRA, P. C.; GALLER, R. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 5, p. 1256–1265, 19 fev. 2014.

BOUAZIZ, J.-D.; YANABA, K.; TEDDER, T. F. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. **Immunological Reviews**, v. 224, p. 201–214, ago. 2008.

BROCKMAN, M. A. et al. IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. **Blood**, v. 114, n. 2, p. 346–356, 9 jul. 2009.

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

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, p. e49828, 10 dez. 2012.

CAMPI-AZEVEDO, A. C. et al. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 391, 15 jul. 2014.

CLERICI, M. et al. Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 2, p. 768–775, fev. 1994.

COHEN, M. S. et al. Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. **The New England journal of medicine**, v. 375, n. 9, p. 830–839, 1 set. 2016.

COLIN DE VERDIERE, N. et al. Immunogenicity and safety of yellow fever vaccine in HIV-1-infected patients: ANRS EP46 NOVAA. **AIDS**, p. 1, ago. 2018.

Cross-regulation between cytokine and microRNA pathways in T cells - Amado - 2015 - European Journal of Immunology - Wiley Online Library. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201545487>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

CUI, W. et al. miRNA-520b and miR-520e sensitize breast cancer cells to complement attack via directly targeting 3'UTR of CD46. **Cancer Biology & Therapy**, v. 10, n. 3, p. 232–241, 1 ago. 2010.

CURTALE, G. et al. An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 265–273, 14 jan. 2010.

DALMAY, T. MicroRNAs and cancer. **Journal of Internal Medicine**, v. 263, n. 4, p. 366–375, abr. 2008.

D'ARC, M. et al. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 11, p. E1343–E1352, 17 mar. 2015.

DE MENEZES MARTINS, R.; FERNANDES LEAL, M. DA L.; HOMMA, A. Serious adverse events associated with yellow fever vaccine. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 9, p. 2183–2187, 2015.

DE MOURA, D. F. Participação do CD163 na Via Anti-inflamatória do Polo Lepromatoso da Hanseníase. p. 98, [s.d.].

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 4, p. 915–924, 1 out. 1991.

DO, T. et al. MicroRNA networks associated with active systemic juvenile idiopathic arthritis regulate CD163 expression and anti-inflammatory functions in macrophages through two distinct mechanisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, n. 1, p. 71–85, 2018.

DROSTE, A.; SORG, C.; HÖGGER, P. Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 256, n. 1, p. 110–113, 5 mar. 1999.

DUARTE DOS SANTOS, C. N. et al. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. **Virus Research**, v. 35, n. 1, p. 35–41, 1 jan. 1995.

DUMORTIER, O.; HINAULT, C.; VAN OBBERGHEN, E. MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 3, p. 312–324, 3 set. 2013.

EGAÑ A-GORROÑ, L. et al. Differential MicroRNA Expression Profile between Stimulated PBMCs from HIV-1 Infected Elite Controllers and Viremic Progressors. **PLOS ONE**, 2014.

ETTINGER, R. et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 175, n. 12, p. 7867–7879, 15 dez. 2005.

FAUCI, A. S. et al. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 124, n. 7, p. 654–663, 1 abr. 1996.

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.

FRADICO, J. R. B. et al. CCL3, CCL5, IL-15, IL-1Ra and VEGF compose a reliable algorithm to discriminate classes of adverse events following 17DD-YF primary vaccination according to cause-specific definitions. **Vaccine**, v. 39, n. 31, p. 4359–4372, 13 jul. 2021.

FRANCO, D. et al. Evaluation of yellow fever virus 17D strain as a new vector for HIV-1 vaccine development. **Vaccine**, v. 28, n. 35, p. 5676–5685, 9 ago. 2010.

FREEMAN, M. L. et al. Cytokines and T-Cell Homeostasis in HIV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. Suppl 2, p. S51–S57, 1 out. 2016.

FRÖHLICH, A. et al. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5934, p. 1576–1580, 19 jun. 2009.

FUJIMOTO, M.; SATO, S. B cell signaling and autoimmune diseases: CD19/CD22 loop as a B cell signaling device to regulate the balance of autoimmunity. **Journal of Dermatological Science**, v. 46, n. 1, p. 1–9, 1 abr. 2007.

GANTIER, M. P. New perspectives in MicroRNA regulation of innate immunity. **Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 30, n. 5, p. 283–289, maio 2010.

GAO, F. et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 436–41, fev. 1999.

GAUCHER, D. et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 13, p. 3119–31, 22 dez. 2008.

GERSHMAN, M. D.; STAPLES, J. Yellow fever. In: **Public Health Resources**. [s.l.: s.n.].

GOLDSTEIN, J. L.; HELGESON, J. A.; BROWN, M. S. Inhibition of cholesterol synthesis with compactin renders growth of cultured cells dependent on the low density lipoprotein receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 12, p. 5403–5409, 25 jun. 1979.

GORELIK, L.; FLAVELL, R. A. Abrogation of TGFβ signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 171–181, fev. 2000.

GORODKIN, J.; RUZZO, W. L. (EDS.). **RNA Sequence, Structure, and Function: Computational and Bioinformatic Methods, Texto original**. [s.l.] Humana Press, 2014.

GREENWELL-WILD, T. et al. Interleukin-27 inhibition of HIV-1 involves an intermediate induction of type I interferon. **Blood**, v. 114, n. 9, p. 1864–1874, 27 ago. 2009.

GUY, B.; SAVILLE, M.; LANG, J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. **Human Vaccines**, v. 6, n. 9, 16 set. 2010.

HALL, W. C. et al. Demonstration of Yellow Fever and Dengue Antigens in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Human Liver by Immunohistochemical Analysis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 4, p. 408–417, 1 out. 1991.

HAN, J. et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes & Development**, v. 18, n. 24, p. 3016–3027, 15 dez. 2004.

HARALAMBIEVA, I. H. et al. Differential miRNA expression in B cells is associated with inter-individual differences in humoral immune response to measles vaccination. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0191812, 30 jan. 2018.

HARGER, J. H. et al. Risk factors for preterm premature rupture of fetal membranes: a multicenter case-control study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 163, n. 1 Pt 1, p. 130–137, jul. 1990.

HAWRYLOWICZ, C. M.; O'GARRA, A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nature Reviews. Immunology**, v. 5, n. 4, p. 271–283, abr. 2005.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 3, p. 621–636, 1 fev. 1990.

HO, Y. L. et al. Vaccination in Brazilian HIV-Infected Adults: A Cross-Sectional Study. **AIDS Patient Care and STDs**, v. 22, n. 1, p. 65–70, jan. 2008.

HOLODNIY, M. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 676–679, abr. 1991.

HOU, J. et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 183, n. 3, p. 2150–2158, 1 ago. 2009.

HUANG, X.-J. et al. Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 7, p. 756–782, 31 jul. 2006.

HUANG, Y. et al. Vaccine Immune Responses to the Yellow Fever 17D Temporal Transcriptomic Changes of A Systems Vaccinology Approach Reveals. 2018.

HUNT, P. W. et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 10, p. 1534–1543, 15 maio 2003.

Informe nº 10 | 2017/2018 , Ministério da Saúde. . [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/25/af-informe-febre-amarela-10-25jan18.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2019.

Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 3, p. 937–947, 1 mar. 1996a.

Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 3, p. 937–947, 1 mar. 1996b.

IORIO, M. V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 16, p. 7065–7070, 15 ago. 2005.

IORIO, M. V.; CROCE, C. M. microRNA involvement in human cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 6, p. 1126–1133, jun. 2012.

IORIO, M. V.; CROCE, C. M. LEWIN B. [s.d.].

KENGSAKUL, K.; SATHIRAPONGSASUTI, K.; PUNYAGUPTA, S. Fatal myeloencephalitis following yellow fever vaccination in a case with HIV infection. **Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het thangphaet**, v. 85, n. 1, p. 131–4, jan. 2002a.

KENGSAKUL, K.; SATHIRAPONGSASUTI, K.; PUNYAGUPTA, S. Fatal myeloencephalitis following yellow fever vaccination in a case with HIV infection. **Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het Thangphaet**, v. 85, n. 1, p. 131–134, jan. 2002b.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 126–139, fev. 2009.

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, set. 2012.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485–517, 2009.

KRIEGER, M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. **Current Opinion in Lipidology**, v. 8, n. 5, p. 275–280, out. 1997.

KUNO, G.; GÓMEZ, I.; GUBLER, D. J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36, n. 1, p. 153–159, jan. 1987.

LAM, L. K. M. et al. Gamma-interferon exerts a critical early restriction on replication and dissemination of yellow fever virus vaccine strain 17D-204. **NPJ vaccines**, v. 3, p. 5, 2018.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545–551, mar. 1992.

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

LEDERMAN, M. M. et al. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 8, p. 1217–1226, 15 out. 2011.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 3 dez. 1993.

LEONARD, W. J.; SPOLSKI, R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 5, n. 9, p. 688–698, set. 2005.

LEWIN B. **Pearson Prentice Hall: Upper Saddle River**. 8. ed. [s.l: s.n.].

LI, S. et al. Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biological study of 5 human vaccines HHS Public Access. **Nat Immunol**, v. 15, n. 2, p. 195–204, 2014.

LINDSAY, M. A. microRNAs and the immune response. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 7, p. 343–351, jul. 2008.

LINDSEY, N. P. et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination, 2007–13. **Journal of Travel Medicine**, v. 23, n. 5, p. taw045, maio 2016.

LIU, Y. et al. Env length and N-linked glycosylation following transmission of human immunodeficiency virus Type 1 subtype B viruses. **Virology**, v. 374, n. 2, p. 229–33, maio 2008.

LU, L.-F. et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. **Cell**, v. 142, n. 6, p. 914–929, 17 set. 2010.

MA, Y. et al. Molecular Sciences Involvement of Host Non-Coding RNAs in the Pathogenesis of the Influenza Virus. 2016.

MARTIN, C. et al. Immunogenicity and duration of protection after yellow fever vaccine in people living with human immunodeficiency virus: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 7, p. 958–967, jul. 2021.

MARTÍN-MORENO, A.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A. Dendritic Cells, the Double Agent in the War Against HIV-1. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 23 out. 2019.

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, abr. 2007.

MAURI, C.; EHRENSTEIN, M. R. The “short” history of regulatory B cells. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 1, p. 34–40, jan. 2008.

MAZAN-MAMCZARZ, K. et al. Down-Regulation of eIF4GII by miR-520c-3p Represses Diffuse Large B Cell Lymphoma Development. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 1, p. e1004105, 30 jan. 2014.

MCCOY, C. E. et al. IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 27, p. 20492–20498, 2 jul. 2010.

MCKENNA, K.; BEIGNON, A.-S.; BHARDWAJ, N. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. **Journal of Virology**, v. 79, n. 1, p. 17–27, jan. 2005.

MILLER, J. D. et al. Human Effector and Memory CD8+ T Cell Responses to Smallpox and Yellow Fever Vaccines. **Immunity**, v. 28, n. 5, p. 710–722, maio 2008.

MOIR, S.; CHUN, T.-W.; FAUCI, A. S. Pathogenic mechanisms of HIV disease. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 223–248, 2011.

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

MONATH, T. P. et al. A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 17, p. 6694–6699, 25 abr. 2006.

MONATH, T. P.; BARRETT, A. D. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. **Advances in Virus Research**, v. 60, p. 343–395, 2003.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. v. 64, mar. 2015a.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, mar. 2015b.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683–765, 2001.

MORLANDO, M. et al. Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. **Nature structural & molecular biology**, v. 15, n. 9, p. 902–909, 1 set. 2008.

MUEMA, D. M. et al. Association between the cytokine storm, immune cell dynamics, and viral replicative capacity in hyperacute HIV infection. **BMC Medicine**, v. 18, 25 mar. 2020.

NAKAYA, H. I.; LI, S.; PULENDRAN, B. Systems vaccinology: learning to compute the behavior of vaccine induced immunity. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, n. 4 (2):193-205, 2012.

NARAYAN, K. M. V. et al. HIV and noncommunicable disease comorbidities in the era of antiretroviral therapy: a vital agenda for research in low- and middle-income country settings. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 67 Suppl 1, p. S2-7, 1 set. 2014.

NARIMAN-SALEH-FAM, Z. et al. In silico dissection of miRNA targetome polymorphisms and their role in regulating miRNA-mediated gene expression in esophageal cancer. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 74, n. 4, p. 483–497, 12 dez. 2016.

NIELSEN-SAINES, K. et al. Three postpartum antiretroviral regimens to prevent intrapartum HIV infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 25, p. 2368–2379, 21 jun. 2012.

- NOVY, P. et al. Intrinsic IL-21 signaling is critical for CD8 T cell survival and memory formation in response to vaccinia viral infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 186, n. 5, p. 2729–2738, 1 mar. 2011.
- O'CONNELL, R. M.; RAO, D. S.; BALTIMORE, D. microRNA regulation of inflammatory responses. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 295–312, 2012.
- O'GARRA, A. et al. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunological Reviews**, v. 223, p. 114–131, jun. 2008.
- OKOYE, A. A.; PICKER, L. J. CD4(+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. **Immunological Reviews**, v. 254, n. 1, p. 54–64, jul. 2013.
- O'NEILL, L. A.; SHEEDY, F. J.; MCCOY, C. E. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 163–175, mar. 2011.
- ONODA, T. et al. Human CD4+ central and effector memory T cells produce IL-21: effect on cytokine-driven proliferation of CD4+ T cell subsets. **International Immunology**, v. 19, n. 10, p. 1191–1199, out. 2007.
- PANTALEO, G.; FAUCI, A. S. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 487–512, 1995.
- PAREEK, S. et al. MiR-155 induction in microglial cells suppresses Japanese encephalitis virus replication and negatively modulates innate immune responses. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 97, 29 maio 2014.
- PARRISH-NOVAK, J. et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 57–63, 2 nov. 2000.
- PATEL, P. et al. Estimating per-act HIV transmission risk: a systematic review. **AIDS (London, England)**, v. 28, n. 10, p. 1509–1519, 19 jun. 2014.
- PHILIPPIDIS, P. et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. **Circulation Research**, v. 94, n. 1, p. 119–126, 9 jan. 2004.
- PISTONI, T. et al. Immunogénicité et tolérance du vaccin amaril chez le voyageur vivant avec le VIH, France, 2005. **BEH thématique**, v. 25–26, jun. 2017.
- POPOVIC, M. et al. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 497–500, 4 maio 1984.
- PULENDRAN, B. et al. Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. **Immunological Reviews**, v. 255, n. 1, p. 243–255, set. 2013.
- QUEREC, T. et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 2, p. 413–24, 20 fev. 2006.

- RAGNI, E. et al. miR-26a-5p is a Stable Reference Gene for miRNA Studies in Chondrocytes from Developing Human Cartilage. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 631, 22 jun. 2019.
- RECEVEUR, M. C. et al. Yellow Fever Vaccination of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients: Report of 2 Cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 3, p. e7–e8, set. 2000.
- 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, out. 1998.
- REN, J. et al. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 20, 23 mar. 2009.
- RODGER, A. J. et al. Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. **Lancet (London, England)**, v. 393, n. 10189, p. 2428–2438, 15 jun. 2019.
- RODRIGUEZ, A. et al. Requirement of bic/microRNA-155 for Normal Immune Function. **Science (New York, N.Y.)**, v. 316, n. 5824, p. 608–611, 27 abr. 2007.
- RONCAROLO, M. G. et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunological Reviews**, v. 212, p. 28–50, ago. 2006.
- SERRANO-VILLAR, S. et al. HIV-Infected Individuals with Low CD4/CD8 Ratio despite Effective Antiretroviral Therapy Exhibit Altered T Cell Subsets, Heightened CD8+ T Cell Activation, and Increased Risk of Non-AIDS Morbidity and Mortality. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, 15 maio 2014.
- SHARMA, A. et al. Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 14, p. 5761–5766, 7 abr. 2009.
- SI, M.-L. et al. miR-21-mediated tumor growth. **Oncogene**, v. 26, n. 19, p. 2799–2803, 26 abr. 2007.
- SIBAILLY, T. S. et al. Poor antibody response to yellow fever vaccination in children infected with human immunodeficiency virus type 1. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 16, n. 12, p. 1177–1179, dez. 1997.
- SILVIA MONTICELLI. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. **Research Molecular Biology International**, v. 2005, 2005.
- SIMON, L. V.; HASHMI, M. F.; TORP, K. D. Yellow Fever. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.
- STACEY, A. R. et al. Induction of a Striking Systemic Cytokine Cascade prior to Peak Viremia in Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, in Contrast to More Modest and Delayed Responses in Acute Hepatitis B and C Virus Infections. **Journal of Virology**, v. 83, n. 8, p. 3719–3733, abr. 2009.

STAPLES, J. E. et al. Yellow Fever Vaccine Booster Doses: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 64, n. 23, p. 647–650, 19 jun. 2015.

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

STAVNEZER, J. Regulation of antibody production and class switching by TGF-beta. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 155, n. 4, p. 1647–1651, 15 ago. 1995.

STRINDHALL, J. et al. The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: the Swedish HEXA immune study. **Age**, v. 35, n. 3, p. 985–991, jun. 2013.

SULAHIAN, T. H. et al. Development of an ELISA to measure soluble CD163 in biological fluids. **Journal of Immunological Methods**, v. 252, n. 1–2, p. 25–31, 1 jun. 2001.

SULAHIAN, T. H. et al. Cross-linking of FcγR triggers shedding of the hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 1, p. 271–277, jul. 2004.

SUMMERS, N. A.; ARMSTRONG, W. S. Management of Advanced HIV Disease. **Infectious Disease Clinics of North America**, HIV. v. 33, n. 3, p. 743–767, 1 set. 2019.

SWAMINATHAN, S. et al. Differential Regulation of the Let-7 Family of MicroRNAs in CD4+ T Cells Alters IL-10 Expression. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 12, p. 6238–6246, 15 jun. 2012.

TATTEVIN, P. et al. Yellow fever vaccine is safe and effective in HIV infected patients. **AIDS (London, England)**, v. 18, p. 825–827, 2004.

TENORIO, A. R. et al. Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 8, p. 1248–1259, 15 out. 2014.

TESH, R. B. et al. Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical, and immunologic studies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 10, p. 1431–1436, 15 maio 2001.

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

THOMAS, R. E. et al. Reporting rates of yellow fever vaccine 17D or 17DD-associated serious adverse events in pharmacovigilance data bases: systematic review. **Current Drug Safety**, v. 6, n. 3, p. 145–154, jul. 2011.

TIMONEDA, O. et al. Determination of Reference microRNAs for Relative Quantification in Porcine Tissues. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44413, 10 set. 2012.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 239–243, 19 fev. 2007.

VAN DEN HEUVEL, M. M. et al. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 66, n. 5, p. 858–866, nov. 1999.

VASCONCELOS, P. F. DA C. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 244–258, dez. 2002.

VEIT, O. et al. Immunogenicity and Safety of Yellow Fever Vaccination for 102 HIV-Infected Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 659–666, mar. 2009a.

VEIT, O. et al. Immunogenicity and Safety of Yellow Fever Vaccination for 102 HIV-Infected Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 659–666, mar. 2009b.

VEIT, O. et al. Long-term Immune Response to Yellow Fever Vaccination in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Individuals Depends on HIV RNA Suppression Status: Implications for Vaccination Schedule. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 66, n. 7, p. 1099–1108, 19 mar. 2018.

WACLECHE, V. S. et al. The Biology of Monocytes and Dendritic Cells: Contribution to HIV Pathogenesis. **Viruses**, v. 10, n. 2, 6 fev. 2018.

WEI, J.-W. et al. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). **Oncology Reports**, v. 37, n. 1, p. 3–9, jan. 2017.

WESTAWAY, E. G. et al. Flaviviridae. **Intervirolgy**, v. 24, n. 4, p. 183–192, 1985.

WILSON, M. E. Infections in HIV-infected Travelers: Risks and Prevention. **Annals of Internal Medicine**, v. 114, n. 7, p. 582, abr. 1991.

YANABA, K. et al. The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 12, p. 7459–7472, 15 jun. 2009.

YANG, H. et al. Identification of CD163 as an antiinflammatory receptor for HMGB1-haptoglobin complexes. **JCI Insight**, v. 1, n. 7, 19 maio 2016.

YI, J. S.; DU, M.; ZAJAC, A. J. A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5934, p. 1572–1576, 19 jun. 2009.

YI, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes & Development**, v. 17, n. 24, p. 3011–3016, 15 dez. 2003.

ZAN, H.; CASALI, P. Epigenetics of Peripheral B-Cell Differentiation and the Antibody Response. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 14 dez. 2015.

ZILAH, E. et al. Increased microRNA-146a/b, TRAF6 gene and decreased IRAK1 gene expressions in the peripheral mononuclear cells of patients with Sjögren's syndrome. **Immunology Letters**, v. 141, n. 2, p. 165–168, 30 jan. 2012.

Este projeto foi adicionado ao Macro-projeto sob forma de emenda e obteve aprovação do comitê de Ética em pesquisa CEP) do INI, sob número de parecer: 2.890.564 e CAEE: 67136517.9.0000.5262.

INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI / FIOCRUZ	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	
DADOS DA EMENDA	
Título da Pesquisa: Estudo de Fase IV para avaliar a imunogenicidade a segurança da vacina contra Febre Amarela em pacientes infectados pelo HIV	
Pesquisador: Lara Esteves Coelho	
Área Temática:	
Versão: 4	
CAAE: 67136517.9.0000.5262	
Instituição Proponente: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ	
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	
DADOS DO PARECER	
Número do Parecer: 2.890.564	
Apresentação do Projeto:	
Trata-se de ensaio clínico, fase IV, não randomizado, de 1 ano de duração, a ser conduzido dentro da rotina de atendimento aos pacientes portadores de infecção pelo HIV acompanhados no Instituto Nacional de Infectologia (INI/Fiocruz) pela equipe de pesquisa do Laboratório de Pesquisa Clínica em DST/AIDS deste Instituto, onde participantes infectados pelo HIV com CD4 > 200 células/mm ³ e adultos não infectados pelo HIV serão submetidos a vacinação contra Febre Amarela. Haverá uso de fontes secundárias de dados, como prontuários e exames laboratoriais. O estudo não é multicêntrico e 400 indivíduos serão abordados pessoalmente, recrutados, ou sofrerão algum tipo de intervenção no centro de pesquisa. Os indivíduos	

10. Apêndice

Tabela Suplementar 1: Dados clínicos laboratoriais dos participantes do estudo

Parâmetros	Níveis	NPHIV		PVHIV	
		D0	D5	D0	D5
Hemácias	normal	22 (15.7%)	18 (12.9%)	38 (27.1%)	38 (27.1%)
	alterado	0 (0%)	2 (1.4%)	11 (7.9%)	11 (7.9%)
Leucócitos	normal	20 (14.2%)	20 (14.2%)	41 (29.2%)	32 (22.9%)
	alterado	1 (0.7%)	1 (0.7%)	9 (6.4%)	16 (11.4%)
Plaquetas	normal	21 (15%)	21 (15%)	49 (35%)	49 (35%)
	alterado	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
AST	normal	21 (15%)	21 (15%)	49 (35%)	49 (35%)
	alterado	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
ALT	normal	21 (15%)	21 (15%)	49 (35%)	49 (35%)
	alterado	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Bilirrubina	normal	13 (9.3%)	11 (7.9%)	22 (15.7%)	22 (15.7%)
	alterado	7 (5%)	9 (6.4%)	28 (20%)	28 (20%)

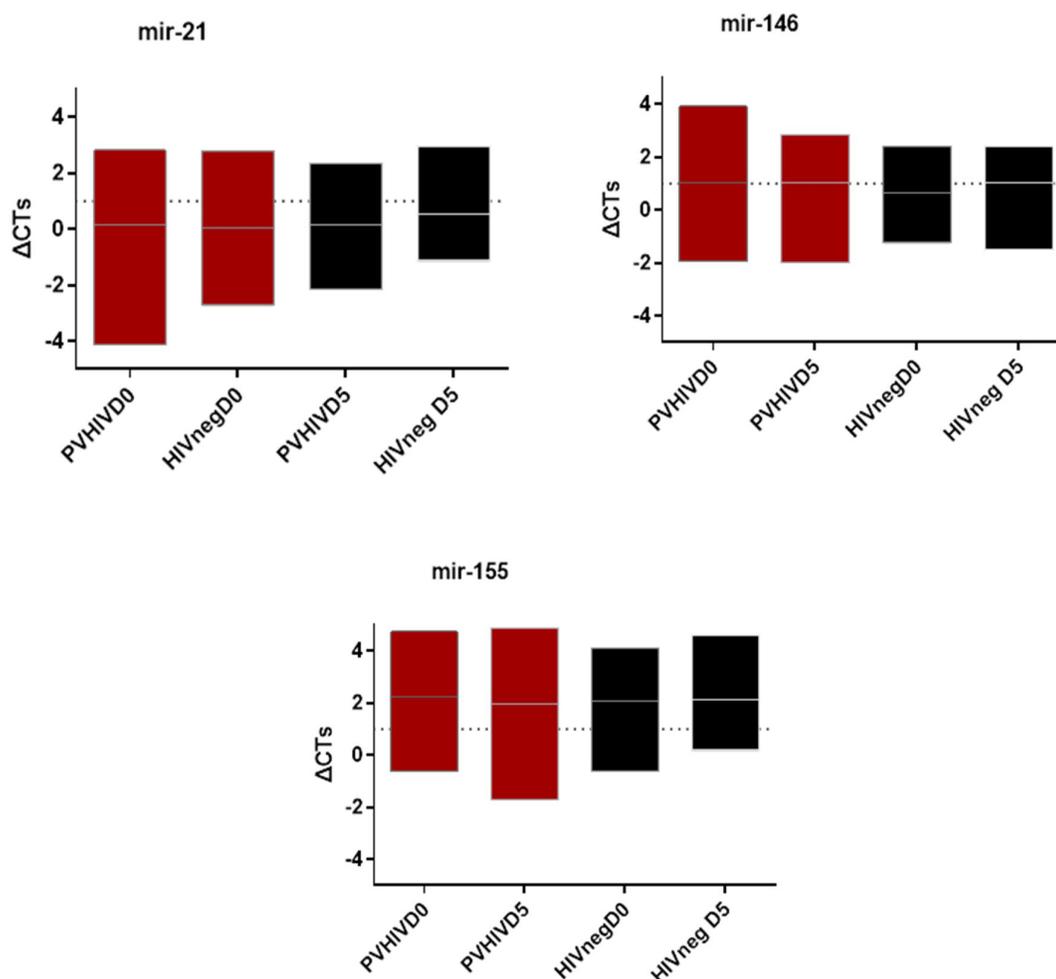
Tabela Suplementar 2: Valores de Δ CT das citocinas e receptores nos dias zero e cinco nos grupos PVHIV e HIVneg.

Alvo	PVHIV		HIVneg	
	Δ CTD0	Δ CTD5	Δ CTD0	Δ CTD5
IL-6	13,32	13,57	14,2	13,57
IL-10	13,74	12,96	14,16	14,49
IL-21	17,39	17,14	17,24	17,03
TGF- β	7,79	7,8	7,23	8
CD19	8,15	8,6	8,08	8,7
CD163	6,8	6,57	6,16	6,1

Tabela Suplementar 3: Valores de Δ CT dos miRNAs nos dias zero e cinco nos grupos PVHIV e HIVneg.

Alvo	PVHIV		HIVneg	
	Δ CTD0	Δ CTD5	Δ TD50	Δ CTD5
mir-21	0,1715	0,331	0,157	0,3535
mir-146	0,8255	1,0195	0,9065	1,252
mir-155	2,227	2,3675	2,227	2,431

Figura Suplementar 1: Valores de Δ CTs do mir-21, mir-146 e mir-155.



Representamos no eixo Y os valores de Δ CT e no eixo X, os grupos do estudo por dia de análise. O teste aplicado foi de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$