

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA VACINAL ANTIAMARÍLICA EM CRIANÇAS
E ADULTOS, UTILIZANDO O MODELO PANORÂMICO DE ANÁLISE
IMUNOFENOTÍPICA**

por

Maria Luiza Silva

Belo Horizonte
Agosto/2011

TESE DDIP-CPqRR M.L. SILVA 2011

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA VACINAL ANTIAMARÍLICA EM CRIANÇAS
E ADULTOS, UTILIZANDO O MODELO PANORÂMICO DE ANÁLISE
IMUNOFENOTÍPICA**

por

Maria Luiza Silva

**Tese apresentada com vistas à obtenção
do Título de Doutor em Ciências na área
de concentração Doenças Infecciosas e
Parasitárias.**

Orientação: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Belo Horizonte
Agosto/2011

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

S586c
2011

Silva, Maria Luiza.

Caracterização da resposta vacinal antiamarílica em crianças e adultos, utilizando o modelo panorâmico de análise imunofenotípica / Maria Luiza Silva. – Belo Horizonte, 2011.

xviii, 89 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 93 - 107

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Febre Amarela/imunologia 2. Vacina contra Febre Amarela/análise 3. Citocinas/síntese química 4. Citometria de fluxo/métodos I. Título. II. Martins Filho, Olindo Assis (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.918 54

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA VACINAL ANTIAMARÍLICA EM CRIANÇAS
E ADULTOS, UTILIZANDO O MODELO PANORÂMICO DE ANÁLISE
IMUNOFENOTÍPICA**

por

Maria Luiza Silva

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho (Presidente)

Profa. Dra. Iramaya Rodrigues Caldas

Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

Profa. Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Prof. Dr. Oscar Bruna-Romero

Suplente: Profa. Dra. Cristina Toscano Fonseca

Tese defendida e aprovada em: 05/08/2011

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisa René Rachou - Fiocruz, sob a orientação do Doutor Olindo Assis Martins Filho e contou com a colaboração de:

Dr. Akira Homma - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Dr. Ricardo Galler - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Dr. Marcos da Silva Freire - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Dr. Luiz Antônio B. Camacho - ENSP/Fiocruz

Dr. Reinaldo Menezes - ASCLIN/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Dra. Maria de Lourdes S. Maia - ASCLIN/Bio-Manguinhos /Fiocruz

Dra. Silvana Maria Elói Santos - Faculdade de Medicina/UFGM

Dr. José Geraldo Leite Ribeiro - SES/MG

Dra. Andréa Teixeira Carvalho - CPqRR/Fiocruz

Dra. Ana Carolina Campi Azevedo - CPqRR/Fiocruz

Dra. Denise da Silveira Lemos - Universidade Federal de Ouro Preto

Dr. Renato Sathler Avelar - CPqRR/Fiocruz

Ms. Marina Ângela Martins - CPqRR/Fiocruz

Apoio Financeiro:

Bio-Manguinhos/Fiocruz (nº 05/05, 05/08 e CC#009/2010)

CNPq (nº 479663/2004-1, 308651/2006-5, 472782/2009-6 e 303316/2009-8)

FAPEMIG (nº APQ 01183-08, APQ 01877-10 e PDJ 00265-09).

Dedico este trabalho aos meus pais, Sebastião e Irene, que não mediram esforços para que eu chegasse a esta etapa muito importante da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Olindo Assis Martins-Filho, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, apoiando-me e incentivando-me desde o mestrado, pela orientação e condução dos meus caminhos através da pesquisa, proporcionando oportunidades que me fizeram crescer não só profissionalmente, mas como pessoa e, acima de tudo, por me incentivar a ser uma pessoa melhor.

À Dra. Silvana Maria Elói Santos por me “despertar” para a área da pesquisa, por me oferecer a oportunidade e o incentivo para iniciar o mestrado, pelos ensinamentos valiosos, pelo apoio, compreensão e cooperação durante todas as fases deste trabalho.

À Andréa Teixeira, pelos ensinamentos, incentivo e cooperação em todas as fases deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, pelos ensinamentos, amizade e colaboração. Este trabalho só foi possível devido à contribuição de todos vocês.

À Marina Ângela, pela amizade, ensinamentos, incentivo e cooperação em todas as fases do trabalho desde a época do mestrado.

À Ana Carolina Campi e Denise Lemos, pelos ensinamentos, incentivo, pela colaboração em todas as fases do trabalho, mas principalmente nas correções e sugestões nas fases finais da elaboração da tese.

Ao Maurício Batista, pela amizade, incentivo e colaboração.

Aos colegas do Laboratório Central e DIP, pela amizade, incentivo e apoio.

À colega de trabalho Letícia Santos, pela amizade, incentivo, apoio e compreensão.

Aos funcionários da Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais pela colaboração nas etapas de recrutamento dos voluntários, vacinação e colheita de amostras sanguíneas.

A todos os pesquisadores e instituições colaboradoras deste estudo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo.

À diretoria do Centro de Pesquisas René Rachou, Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira, Dr. Carlos Leomar Zani, Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta e Dra. Zélia Maria Profeta da Luz.

Aos professores e funcionários da Pós-graduação em Ciências da Saúde.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa René Rachou.

A todos os voluntários que participaram deste estudo, sem os quais o trabalho não seria possível.

E aos meus familiares e amigos por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, em especial, aos meus pais Sebastião e Irene, ao meu irmão Júnior Jáber e, especialmente, às minhas amigas Lílian Carolina e Selme Regina.

Sumário

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 A estrutura do vírus	19
1.2 Ciclo de transmissão e aspectos epidemiológicos	21
1.3 Tratamento e prevenção	25
1.4 Breve histórico da vacina antiamarílica amostra 17D	26
1.5 Bases moleculares da atenuação da vacina 17D	27
1.6 A imunidade induzida pela vacina 17D	28
1.6.1 A resposta humoral.....	28
1.6.2 A resposta celular	29
1.7 Eficácia vacinal	32
1.8 Segurança vacinal.....	33
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3 MÉTODOS	38
3.1 Grupos de estudo e amostras biológicas	38
3.1.1 Estudo em adultos	38
3.1.2 Estudo em casos de reações adversas	39
3.1.3 Estudo em crianças	39
3.1.4 Lote da vacina antiamarílica	40
3.2 Metodologias empregadas	41
3.2.1 Teste de soroneutralização.....	41

3.2.2	Análise imunofenotípica.....	41
3.2.3	Microcultura de células de sangue periférico e marcação de superfície e de citocinas intracitoplasmáticas	43
3.2.4	Análise dos níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas	46
3.3	Estratégias de análises	47
3.3.1	Análise da população de neutrófilos	47
3.3.2	Análise da população de monócitos	49
3.3.3	Análise da população de linfócitos.....	49
3.3.4	Análise do perfil panorâmico.....	50
3.3.4.1	Estudo em adultos	50
3.3.4.2	Estudo em crianças	51
3.4	Análise estatística dos dados.....	52
4	RESULTADOS.....	54
4.1	Artigo 1. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults.....	55
4.2	Artigo 2. Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination.....	65
4.3	Artigo 3. Cytokine Signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody.....	75
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
6	ANEXO.....	92
7	REFERÊNCIAS.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Flavivirus</i> . A) Partícula viral esquematizada, mostrando a estrutura básica do vírus B) Genoma viral.....	20
Figura 2: Áreas com recomendação da vacina antiamarílica.....	23
Figura 3: Expansão das áreas epidemiológicas de febre amarela no Brasil, de 1997 a 2011	24
Figura 4: Perfil de análise de neutrófilos. A) Perfil de distribuição celular, considerando o marcador fenotípico CD16/FITC <i>versus</i> granulosidade celular. B) Perfil de distribuição celular, considerando a fluorescência 1 (CD16/FITC) <i>versus</i> fluorescência 2 (IL-4/PE) da população selecionada na janela R1 do gráfico A. C) Perfil de distribuição celular, considerando o marcador fenotípico CD14/TC <i>versus</i> granulosidade celular. D) Perfil de distribuição celular, considerando a fluorescência 3 (CD14/TC) <i>versus</i> fluorescência 2 (IL-10/PE) da população selecionada na janela R1 do gráfico C....	48
Figura 5: Perfil de análise de monócitos. A) Perfil de distribuição celular, considerando o marcador fenotípico CD14/TC <i>versus</i> granulosidade celular - uma abordagem específica utilizada para análise da população monocitária. B) Perfil de distribuição celular, considerando a fluorescência 3 (CD14/TC) <i>versus</i> fluorescência 2 (TNF- α /PE) da população selecionada na janela R1 do gráfico A.....	49
Figura 6: Ilustração da análise convencional de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular, considerando o tamanho <i>versus</i> granulosidade celular. B) perfil de distribuição celular, considerando a fluorescência 1 (CD8/TC) <i>versus</i> fluorescência 2 (IL-10/PE), da população selecionada na janela R1 do gráfico.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromos, utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície42

Tabela 2: Anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromos, utilizados para análise de populações e subpopulações celulares da microcultura de sangue periférico.....45

Tabela 3: Anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromos, utilizados para identificação de citocinas intracitoplasmáticas em microcultura de sangue periférico 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	- Percentual	CBA	- “Cytometric Bead Array” – Ensaio com microesferas fluorescentes
°C	- Graus Celsius	CCL2	- Proteína-1 Quimioatraente de monócito
CO ₂	- Dióxido de Carbono	CCR	- Receptor de quimiocinas CC
g	- Gramas	CD	- “Cluster Designation” – grupo de diferenciação
g/l	- Gramas por litro	CD4 ⁺	- Células T auxiliares
Log ₁₀	- Logaritmo em base 10	CD8 ⁺	- Células T citotóxicas
mg	- Miligrama	CD19 ⁺	- Células B
mcg	- Micrograma	CDC	- “Center For Disease Control and Prevention” – Instituição americana para prevenção e controle de doenças
mL	- Mililitro	CNEPI	- Centro Nacional de Epidemiologia
µL	- Microlitro	CPqRR	- Centro de Pesquisa René Rachou
M	- Molar	CXCL	- Ligante quimiocina CXC
mM	- Milimol	CXCR	- Receptor de quimiocinas CXC
mUI/mL	- Mili-unidades internacionais por mililitro	17DD	- subamostra vacina antiamarílica
mm	- Milímetro	DN	- Doença neurotrópica
nm	- Nanômetro	DV	- Doença viscerotrópica
pH	- Potencial de hidrogênio	EAG	- Eventos adversos graves
pg/mL	- Picograma por mililitro	EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
aa	- Aminoácidos	ELISA	- “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” - Ensaio imunoenzimático
AIDS	- Síndrome da imunodeficiência adquirida	EMDA	- Encefalomielite disseminada aguda
ASCLIN	- Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos	FA	- Febre amarela
ATCC	- “American Type Culture Collection” – Instituição americana referência em padrões de microorganismos e linhagens celulares	FAS	- Febre amarela silvestre
BD	- Becton Dickinson – Empresa americana de biotecnologia médica	FAU	- Febre amarela urbana
BSA	- “Bovine serum albumin” –Albumina de soro bovino		
C	- Capsídeo (proteína de)		
FACS	- “Fluorescence Activated Cell Sorting” – marca registrada da BD		

FcγR	- Receptor de Fc gama	NCR	- “Non coding region” -
Fiocruz	- Fundação Oswaldo Cruz	Regiões não-codificantes	
FITC	- Fluorescein isotiocyanate –	NK	- “Natural Killer”
Isotiocianato de fluoresceína		NKT	- “Natural killer T”
FL	- Fluorescência	NS	- Proteína não-estrutural
FNV	- Vacina Neurotrópica Francesa	NT	- Nucleotídeos
FSC	- “Forward scatter” – Dispersão	NV	- Não vacinada (criança)
frontal		OMS	- Organização Mundial da
FUNASA	- Fundação Nacional de Saúde	Saúde	
HLA-DR	- Antígeno Leucocitário Humano, locus DR	OPAS	- Organização Pan Americana da Saúde
IFN-α/β	- Interferon do tipo I	ORF	- “Open Reading Frame” –
IFN-γ	- Interferon-gama	Fase aberta de leitura	
Ig	- Imunoglobulina	P	- Permealizante
IL	- “Interleukin” - Interleucina	PBS	- “Phosphate-buffered saline” -
IL-1Ra	- “Interleukin 1 - Receptor antagonist” - antagonista do receptor de interleucina 1	tampão salina-fosfato	
IL-10R	- Receptor de interleucina 10	PE	- “Phycoerythrin” – ficoeretrina
IP-10	- Proteína 10 induzível por Interferon gama	PFU	- “Plaque-forming units” – Unidades formadoras de placas
LATEV	- Laboratório de Vírus de Bio-Manguinhos	PNI	- Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde do Brasil
LNI	- “Log Neutralization Index” – Índice de neutralização, em logaritmo	prM	- Pré-membrana (proteína de)
M	- Membrana (proteína de)	PRNT	- “Plaque reduction neutralization Test” - Teste de Neutralização por Redução em Placa de Lise
mAbs	- Anticorpos monoclonais	PV	- Primovacinadas (crianças)/Primovacinação
MFF	- “Macs Facs Fix” - Solução fixadora para citometria de fluxo	RNA	- Ácido ribonucleico
MG	- Minas Gerais	RPMI	- “Roswell Park Memorial Institute” - meio de cultura
MLD ₅₀	- “Medium Mouse Lethal Dose” - quantidade de vírus capaz de matar 50% dos camundongos injetados	RV	- Revacinadas (crianças)/Revacinação
MS	- Ministério da Saúde	SBS	- Síndrome de Guillain-Barré
		SI-EAPV	- Sistema de Informações de Vigilância de Eventos Adversos Pós-vaci-

nais	Th1	- Linfócito T “helper” Tipo 1
SPF - “Specific Pathogenic Free” – Livre de germes patogênicos	TLR	- “Toll-like Receptor” – Receptor semelhante a Toll.
SSC - “Side scatter” - Dispersão La- teral	TNF- α	- “Tumor Necrosis Factor – α ” - Fator de necrose tumoral alfa
SVS-MS - Secretaria de Vigilância Sani- tária do Ministério da Saúde	UFMG	- Universidade Federal de Mi- nas Gerais
T.A. - Temperatura Ambiente	USA	- “United States of Americ” - Estados Unidos da América
TC - “Tri-Color” – Terceira cor	WHO	- “World Health Organizaton” - Organização Mundial da Saúde
TGF- β - “Transforming growth factor β ” – Fator transformante de crescimento β		

RESUMO

Neste trabalho, o perfil fenotípico e de síntese de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-12) e reguladoras (IL-4, IL-5 e IL-10) em células da imunidade inata (neutrófilos, monócitos e células NK) e adaptativa (linfócitos CD4⁺, linfócitos CD8⁺ e linfócitos CD19⁺) do sangue periférico de indivíduos primo e/ou revacinados com a vacina antiamarílica 17DD, bem como um caso de reação adversa à vacinação foram investigados por citometria de fluxo após cultura rápida *in vitro* na ausência e presença da estimulação antígeno-específica. Foram avaliados 10 adultos saudáveis, com idade entre 21 e 51 anos, em 4 tempos distintos: antes da vacinação, 7, 15 e 30 dias após primovacinação. Após cultura *in vitro* foi observado um perfil global de citocinas pró-inflamatórias, transiente no 7º dia, principalmente devido às células da imunidade inata, seguido por perfil misto de citocinas inflamatórias e reguladoras nos 15º e 30º dias após a vacinação antiamarílica 17DD. Em um 2º estudo, foi observada uma resposta imune adaptativa robusta, acompanhada por anormalidades na resposta do sistema imune inato em um caso de evento adverso grave, seguido à vacinação 17D. Em adição, em um 3º estudo, foram incluídas 60 crianças com idade entre 9 e 47 meses, um ano após a primo e/ou revacinação antiamarílica 17DD, classificadas de acordo com os níveis de anticorpos neutralizantes antiamarílicos apresentados após a vacinação em: respondedoras (médios ou altos títulos de anticorpos neutralizantes), não respondedoras, respondedoras após revacinação e um grupo de crianças não vacinadas. Os dados da avaliação do impacto dos antígenos vacinais 17DD no perfil das citocinas dos leucócitos periféricos destas crianças demonstraram que, na presença de títulos médios de anticorpos neutralizantes após a primovacinação, o estímulo por antígenos vacinais 17DD *in vitro* foi capaz de induzir um perfil balanceado de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, envolvendo células da imunidade inata e adaptativa, enquanto que uma assinatura polarizada reguladora foi observada no grupo de crianças primovacinação não respondedoras e uma assinatura proeminente pró-inflamatória no grupo de crianças que apresentaram títulos altos de anticorpos neutralizantes após a primovacinação. Em conjunto os dados sugerem que uma resposta imune predominantemente do tipo balanceada, com síntese de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, envolvendo tanto células da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa parece ser essencial para a indução de uma resposta imune efetiva e segura após a vacinação antiamarílica.

ABSTRACT

In this study, phenotypic analysis and intracytoplasmic pro-inflammatory (IFN- γ , TNF- α and IL-12) and regulatory (IL-4, IL-5 and IL-10) cytokines synthesis by innate (neutrophils, monocytes and NK cells) and adaptive (CD4⁺ and CD8⁺ T subsets, and CD19⁺) immunity cells of peripheral leucocytes of 17DD yellow fever (YF) prime or revaccinated volunteers, as well as a case of serious adverse events (YF-SAE) temporally associated with 17D YF vaccination were performed using short-term cultures, in absence or presence of YF-17DD-antigens, and single-cell flow cytometry. Ten healthy non-vaccinated volunteers, aged 21 to 51 years were evaluated at four consecutive periods including: before vaccination, 7, 15 and 30 days after vaccination. After whole blood cells culture, the overall cytokine signature showed a transient pro-inflammatory profile at day 7, mainly due to the innate immunity cells, which draws back toward a mixed or modulated pattern at day 15 and day 30 in most vaccines. In another study a robust adaptive response and abnormalities in the innate immune system were observed in one severe adverse event following primary YF-17D vaccination. In addition it was evaluated sixty healthy children with age ranging from 9 to 47 months, one year after 17DD yellow fever prime or revaccination, classified according to anti-YF neutralizing antibodies results after vaccination as seroconverters (medium or high neutralizing antibodies levels), non-seroconverters, seroconverters after revaccination, and a unvaccinated group. The impact of YF-17DD-antigens recall on cytokine profiles of YF-17DD primo-vaccinated children characterized by single-cell flow cytometry after short-term cultures of whole blood samples demonstrate that the overall signature of high cytokine producers triggered by YF-Ag recall is associated with the levels of anti-YF neutralizing antibodies, with a balanced pro-inflammatory and regulatory profile of innate and adaptive immunity being the hallmark of seroconverters who presented medium neutralizing antibodies levels, whereas a polarized regulatory signature is observed in non-seroconverters and a prominent pro-inflammatory signature is characteristic of seroconverters who presented high neutralizing antibodies levels. Taken together, the results suggest that mixed type immune response, pro and anti-inflammatory, involving both innate immunity cells and adaptive immunity cells, it may play a pivotal role in the establishment of effective and safe immunization by yellow fever vaccine.

1 INTRODUÇÃO

A febre amarela (FA) continua sendo um dos grandes problemas de saúde pública mundial. Atualmente, quarenta e dois países estão situados em área endêmica na África e Américas do Sul e uma população de mais de 900 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorra cerca de 200.000 casos da doença e 30.000 mortes a cada ano em todo mundo (1). Nas duas últimas décadas, tem sido observado um aumento do número de casos da doença e, fatores tais como a diminuição da imunidade da população à infecção, o desmatamento, a urbanização, os movimentos populacionais e as mudanças climáticas têm sido apontados como responsáveis por este aumento (1-3). No Brasil, o aumento do risco de ocorrência de febre amarela, em centros urbanos, decorrente do aumento da densidade e distribuição urbana do *Aedes aegypti*, nos últimos anos, tem levado os órgãos de saúde pública a realizarem extensas campanhas de vacinação (4-8). A vacina correntemente em uso, de vírus vivo atenuado, da subamostra 17DD, induz soroconversão em mais de 95% dos indivíduos adultos vacinados (3). Apesar de tratar-se de uma das mais seguras e eficazes vacinas em uso, relatos recentes descrevem a ocorrência de reações adversas graves, até fatais, em indivíduos previamente saudáveis, requerendo uma revisão crítica dos efeitos da vacinação e dos fatores de risco envolvidos. Apesar da relevância dos estudos pós-vacinação antiamarílica 17D no contexto de sua ampla utilização no Brasil e no mundo, poucos dados na literatura abordam o perfil de resposta imune celular de pacientes que receberam a vacina antiamarílica 17DD. Neste contexto, o presente estudo tem por objetivo ampliar os conhecimentos acerca da imunidade contra a febre amarela induzida pela vacina 17DD.

1.1 A estrutura do vírus

O vírus da febre amarela é o protótipo do gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae que inclui aproximadamente 70 espécies de vírus, muitos dos quais, transmitidos por artrópodes (9). São vírus esféricos, envelopados, com projeções na superfície, medindo de 40-60 nm de diâmetro (Figura 1). Apresentam um capsídeo icosaédrico, contendo uma molécula de RNA fita simples com polaridade positiva,

cujo genoma de 10.862 nucleotídeos (NT) codifica o precursor de uma única poliproteína. Este genoma é organizado em uma região codificante única (open reading frame - ORF - fase aberta de leitura), com 10.233 nucleotídeos, na ordem 5'-C-prM-E-NS1-Ns2a-Ns2b-NS3-Ns4a-Ns4b-NS5-3' (Figura 2) (10,11). O processamento da poliproteína resultante da tradução da ORF ocorre no retículo endoplasmático rugoso (12,13) e libera, após clivagem, três proteínas estruturais (C, pré-M e E) e sete não estruturais (NS1, NS2a e NS2b, NS3, NS4a e NS4b, e NS5). A região codificante é flanqueada por duas regiões não codificantes (NCR) de tamanho variável, a 3'NCR com cerca de 511 NT e outra menor, 5'NCR, com 118 NT, ambas importantes para a regulação e expressão do vírus (10,11). As proteínas estruturais codificam a formação da estrutura básica da partícula viral; a proteína C, forma, juntamente com o RNA, o capsídeo viral, a glicoproteína pré-M é precursora da proteína estrutural M, produzida durante o processo de maturação viral e a proteína E dá origem ao envelope. Por outro lado, as proteínas não estruturais são responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus incluindo replicação, virulência e patogenicidade (10-15).

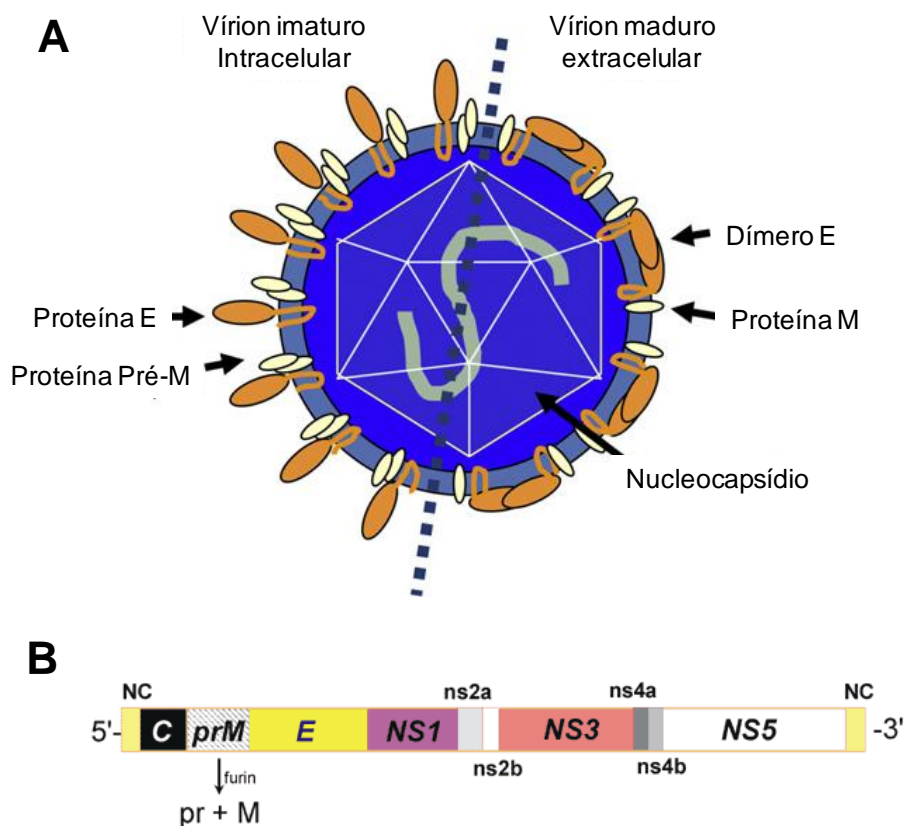


Figura 1: *Flavivirus*. A) Partícula viral esquematizada mostrando a estrutura básica do vírus. Fonte: Gardner & Ryman, 2010 (adaptado). B) Genoma viral. Fonte: Center For Disease Control and Prevention - CDC (adaptado) www.cdc.gov/.../vol7no4/images/petersen1b.gif.

Embora apenas um sorotipo do vírus amarelíco seja reconhecido, há pequenas diferenças genéticas entre as amostras da América e da África que permitem atualmente caracterizar dois e cinco genótipos, respectivamente (16).

1.2 Ciclo de Transmissão e aspectos epidemiológicos

De acordo com a localização geográfica, espécie vetorial e tipo de hospedeiros, três possíveis formas de transmissão são evidenciadas: febre amarela silvestre (FAS), febre amarela intermediária e febre amarela urbana (FAU) (1). A febre amarela silvestre ocorre em florestas tropicais, onde o vírus é mantido em primatas não humanos que são os principais hospedeiros do vírus amarelíco. Diversos mamíferos, também, são suscetíveis à doença, destacando-se como possíveis reservatórios, os marsupiais e alguns roedores (17). A infecção humana ocorre quando uma pessoa não imunizada penetra no ciclo enzoótico natural por motivos ocupacionais ou de lazer. A maioria das infecções ocorre em homens jovens que trabalham na floresta e a transmissão é feita por intermédio de mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* na América (1,17) e *Aedes* na África, onde em áreas secas, o vírus também pode ser isolado a partir de carrapatos *Amblyoma variegatum*, indicando eventual papel desses artrópodes na cadeia de transmissão da virose (16,17). O vírus pode, também, ser mantido durante as estações secas através da transmissão vertical nos mosquitos (18,19). A febre amarela intermediária ocorre em algumas regiões rurais e periurbanas da África, em epidemias de pequena escala, sendo transmitida pelo vetor de ligação entre os ciclos, urbano e silvestre, o mosquito *Ae. simpsoni*. O contato maior entre as pessoas e mosquitos infectados leva a transmissão. Muitas aldeias localizadas em uma mesma área, mas separadas entre si geograficamente, podem sofrer processos simultaneamente. Este é o tipo mais comum de surto na África (1,20,21). A febre amarela urbana ocorre quando as pessoas infectadas introduzem o vírus em áreas densamente povoadas, com um elevado número de indivíduos não imunes e mosquitos *Aedes*, favorecendo a transmissão do vírus de pessoa para pessoa. Uma vez infectada, no ciclo silvestre, a pessoa pode, ao retornar aos centros urbanos, servir como fonte de infecção para o *Ae aegypti* desde 24 a 48 horas antes de surgirem os sintomas até o quinto dia da infecção e este se torna capaz de transmitir o vírus da febre amarela, de 9 a 12 dias após ter picado uma pessoa infectada (3,22). Em áreas urbanas, o *Aedes albopictus*

é um transmissor potencial, embora ainda não tenha sido definitivamente incriminado como vetor da febre amarela; e presume-se que possa servir de ponte entre os ciclos silvestre e urbano da doença devido à sua grande facilidade de adaptação aos ambientes rural, urbano e periurbano (23).

A última epidemia de febre amarela urbana transmitida em território brasileiro ocorreu, em 1929, na cidade do Rio de Janeiro e os últimos casos urbanos reconhecidos foram descritos no município de Sena Madureira, no Estado do Acre, em 1942 (24). Nas Américas, o último registro oficial da doença foi em 1954 em Trinidad e Tobago. Porém, há relatos da doença em área urbana, na Bolívia, em 1997 (25) e, mais recentemente, em 2008, no Paraguai, em uma área urbana do município de San Lorenzo, cerca 15 km de Assunção (8,26). Na África, ainda ocorrem epidemias de febre amarela urbana em regiões contíguas a áreas de floresta chuvosa, onde a febre amarela silvestre é enzoótica (16,17).

Na população humana geralmente o aparecimento de casos é precedido de epizootias em primatas não humanos que geram, em intervalos cíclicos, de cinco a sete anos, surtos de febre amarela silvestre. Nestes animais, a doença manifesta-se periodicamente num intervalo suficiente para o surgimento de novas populações susceptíveis após cada grande epizootia (27). Ao mesmo tempo, não havendo população sítima disponível, o vírus movimenta-se para encontrar novos hospedeiros viáveis visando à manutenção natural. A forma silvestre da doença é endêmica em 29 países da África, onde ocorre maior disseminação da doença (90% dos casos anualmente notificados a OMS) e nas Américas, onde, nos últimos 20 anos, sua ocorrência tem sido registrada em 13 países: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago e Venezuela. (21) (Figura 2).



Figura 2: Áreas com recomendação da vacina antiamarilica. Atualizado em 6 de maio de 2011.

Fonte: CDC (adaptado) <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/yellow-fever.htm>.

No Brasil, a partir do desaparecimento da forma urbana em 1942, só há ocorrência de casos de febre amarela silvestre e os focos endêmicos até 1999 estavam situados nos estados das regiões Norte, Centro-oeste e área pré-amazônica do Maranhão, além de registros esporádicos na parte oeste de Minas Gerais (28). Nos surtos ocorridos no período de 2000 a 2008, observou-se uma expansão da circulação viral no sentido leste e sul do país, detectando-se sua presença em áreas silenciosas há várias décadas. A partir de 2008, com a re-emergência do vírus da febre amarela na região Centro-Oeste, Sudeste e Sul (e com surtos em São Paulo e Rio Grande do Sul), a área geográfica considerada de risco para febre amarela silvestre foi ampliada (Figura 3) (29). Esse caráter dinâmico da epidemiologia da doença tem exigido avaliações periódicas das áreas de risco para melhor direcionamento dos recursos e aplicação das medidas de prevenção e controle (3,29).

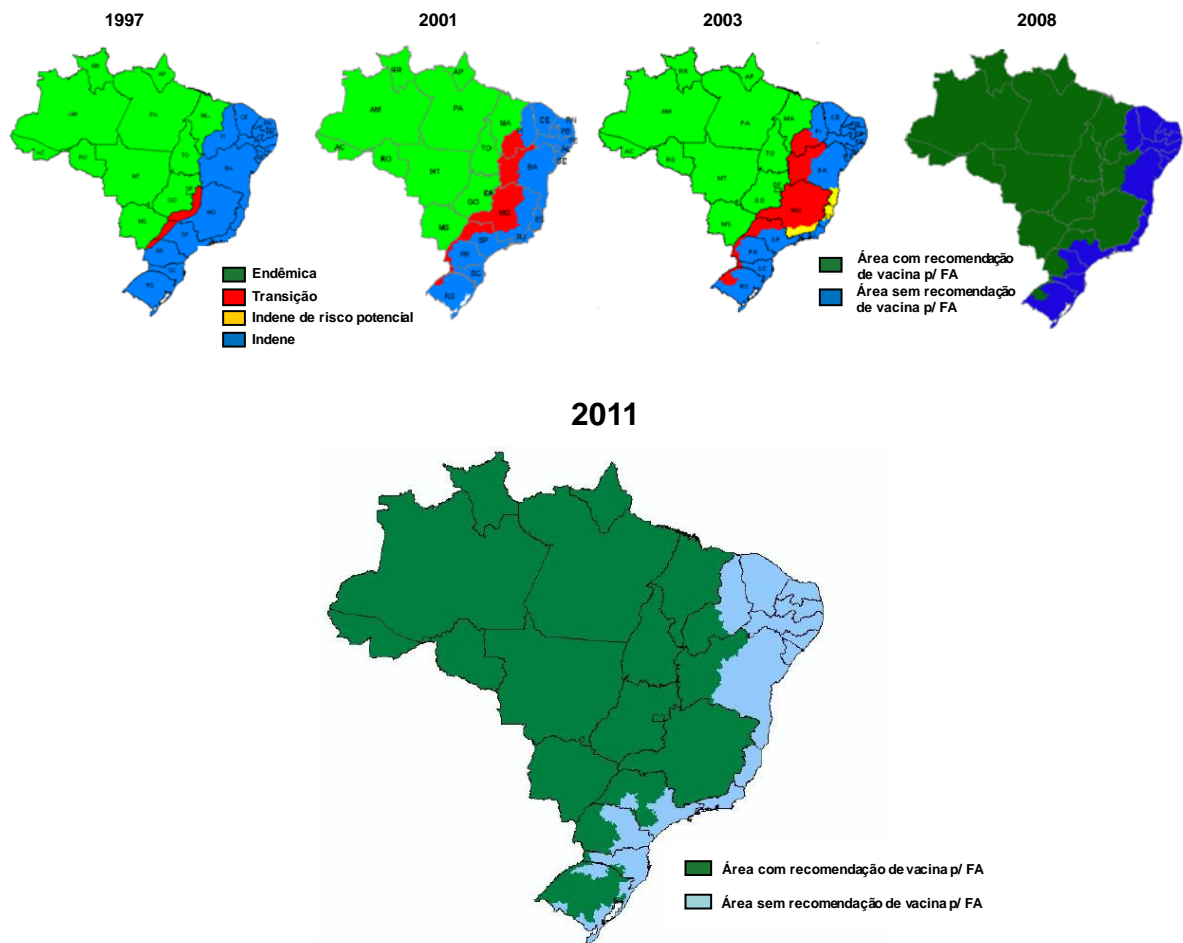


Figura 3: Expansão das áreas epidemiológicas para febre amarela no Brasil de 1997 a 2011.

Fonte: adaptado de CNEPI/FUNASA/MS e apresentação da SVS-MS.

A suscetibilidade à infecção é universal. A infecção confere imunidade permanente. Os filhos de mães imunes podem apresentar imunidade passiva e transitória durante 6 meses. Nas zonas endêmicas, são comuns as infecções leves e inaparentes (3). Acredita-se que a incidência real da doença seja 10 a 50 vezes maior do que é descrito. A mortalidade global da febre amarela situa-se entre 5-10%, percentual elevado quando comparado a outras viroses, inclusive a dengue. Mas quando se consideram apenas os casos graves, a letalidade revela-se maior e, no Brasil, oscila entre 40 a 60% (16,17).

1.3 Tratamento e prevenção

Não existe tratamento específico para a doença. O tratamento é apenas sintomático, com cuidadosa assistência ao paciente que, sob hospitalização, deve permanecer em repouso, com reposição de líquidos e das perdas sanguíneas, quando indicado. Nas formas graves, o paciente deve ser atendido em uma unidade de terapia intensiva, o que reduz as complicações e a letalidade (17,30). A vacina contra febre amarela é a medida mais importante para prevenção e controle da doença. A OMS recomenda atualmente duas vacinas antiamarílicas originárias da amostra 17D, as subamostras 17D-204 e 17DD, consideradas seguras e altamente imunogênicas (31).

No Brasil, o Ministério da Saúde, através do Programa Nacional de Imunizações (PNI), recomenda que a vacina seja aplicada por via subcutânea e em dose única de 0,5 mL, a partir de 9 meses, sem limite de idade, sendo importante o reforço de, no mínimo, de dez em dez anos, especialmente para quem vive ou vai viajar para regiões nas quais há risco de transmissão (3,32,33), e a partir de 6 meses de idade em situações de epidemias.

A vacina é contraindicada em: crianças com menos de 6 meses de idade; em situações de imunodepressão transitória ou permanente induzida por doenças (neoplasias, AIDS e infecção pelo HIV com comprometimento da imunidade) ou pelo tratamento (drogas imunossupressoras acima de 2mg/kg/dia por mais de duas semanas, quimioterapia, radioterapia etc.); gestante, salvo situações de alto risco de exposição; reações anafiláticas relacionadas a ovo de galinha e seus derivados ou a outras substâncias presentes na vacina; indivíduos com doenças autoimunes, doenças neurológicas ou outros problemas de saúde crônicos deverão ser avaliados caso a caso; e recomenda-se o adiamento da vacinação para as mães que estão amamentando bebês até 6 meses de idade (3,33,34).

Em populações em que a cobertura vacinal é baixa, uma vigilância epidemiológica eficiente é crítica para o rápido reconhecimento e controle dos surtos (3). Dentre as medidas utilizadas para manter erradicada a febre amarela urbana no Brasil e evitar surtos de febre amarela silvestre estão, além da vacinação, a notificação imediata de casos humanos, casos de epizootias (principalmente morte de primatas não humanos), achado do vírus em vetor silvestre, a vigilância entomológica e a realização de ações de educação em saúde (3). A doença é de notificação compulsória, portanto todo caso suspeito deve ser prontamente

comunicado por telefone, fax ou e-mail às autoridades, por se tratar de doença grave. A obrigatoriedade da notificação imediata à Organização Pan americana da Saúde (OPAS) sofreu alteração com o Regulamento Sanitário Internacional, 2005 (RSI) que passou a vigorar em todo o mundo em 15 de junho de 2007. Nesse novo contexto, a notificação de caso suspeito às autoridades internacionais ocorre a partir de uma avaliação realizada por meio de um algoritmo de decisões que permite classificar o evento em emergência de saúde pública de importância nacional ou internacional, e que vai determinar a necessidade, ou não, da notificação aos órgãos internacionais (3,35).

1.4 Breve histórico da vacina antiamarílica amostra 17D

Duas vacinas antiamarílicas de vírus vivos atenuados foram desenvolvidas na década de 1930: a Vacina Neurotrópica Francesa (FNV) através de 128 passagens de vírus viscerotrópico humano (também conhecido como vírus Dakar) em cérebro de camundongo e que teve sua produção descontinuada, em 1980, devido à sua associação a alta incidência de casos de encefalites em crianças; e a amostra 17D original (Asibi), desenvolvida por Theiler e Smith em 1937 (36), através da atenuação do vírus selvagem isolado, em 1927, de um paciente africano (Asibi) através de 53 passagens em macacos, com passagens intermitentes em *Ae. aegypti*, 18 passagens em tecidos de embrião de camundongos, 58 passagens em cultura de tecidos de embrião de galinha e passagens adicionais em cultura de tecidos de embrião de galinha desnervado (36,37). Após um total de 180 passagens, a amostra 17D foi isolada e, a partir desta, duas subamostras foram isoladas independentemente: a 17DD na passagem 195 passada mais 48 vezes em cultura de tecidos e mais 41 vezes em ovos embrionados e a subamostra 17D-204, derivada da passagem 204 da 17D original (38-41). Atualmente as vacinas são produzidas em ovos embrionados de galinha, usando a tecnologia que mudou pouco desde 1945 e as duas subamostras utilizadas mundialmente, a 17D-204 e a 17DD, estão nas passagens 235-240 e 287-289, respectivamente (31,42).

A vacina antiamarílica foi a primeira vacina de vírus vivo atenuado a ser empregada em humanos em 1937 (36-37) e a primeira no mundo a usar o sistema de lotes-sementes, isto é, os lotes originais do vírus atenuado são submetidos a uma nova passagem em ovos embrionados, dando origem a lotes secundários que

servirão de fonte para a produção do imunizante. Este sistema visa à manutenção do vírus na mesma passagem com o intuito de diminuir alterações indesejadas quanto às propriedades biológicas do vírus vacinal (31,40,43). Além das subamostras 17D-204 e 17DD, em 1977, o Instituto Robert Koch (Berlin) preparou para a OMS, a subamostra 17D-213/77, uma semente primária, livre de vírus da leucose aviária, originária da subamostra 17D-204 que é mantida como estoque referência, disponível para novos fabricantes (44). Existem atualmente seis fabricantes de vacinas subamostras da 17D original, produzindo uma combinação de aproximadamente 30-60 milhões de doses por ano. Estima-se, que a vacina já tenha sido administrada a mais de 500 milhões de pessoas (42,45). A concentração viral por dose da vacina para aplicação subcutânea não deve ser inferior a 1.000 MLD₅₀ ("Medium Mouse Lethal Dose" - quantidade de vírus capaz de matar 50% dos camundongos injetados) segundo os padrões biológicos da OMS (46). A MLD₅₀ em geral é expressa em escala logarítmica, log₁₀ MLD₅₀. A dose mínima é de 3 log₁₀ MLD₅₀. Atualmente, a concentração de partículas virais na vacina é expressa em PFU (unidades formadoras de placas). Embora não exista uma relação linear entre as metodologias de PFU e MLD₅₀, há quase um paralelismo entre esses valores. Para compensar as perdas de vírus na estocagem, os fabricantes colocam um excedente de vírus em cada frasco (47). Uma dose de vacina contém entre 10⁴ e 10⁶ PFU de uma mistura heterogênea de múltiplas subpopulações de vírions, já que estas vacinas não são biologicamente clonadas (42,48).

1.5 Bases moleculares da atenuação da vacina 17D

O desenvolvimento da vacina contra febre amarela por passagens empíricas, principalmente em tecidos embrionários de galinha, resultou em múltiplas mutações nos genes estruturais e não estruturais do vírus (49), embora tenha sido demonstrado alto grau de similaridade genética entre diversas vacinas produzidas por vários fabricantes (50). Hahn e colaboradores (51) compararam e deduziram a sequência de aminoácidos da amostra Asibi, da vírus selvagem e da vacina 17D-204 e, identificaram 68 trocas de nucleotídeos, codificando 32 substituições de aminoácidos, incluindo 12 no gene da proteína E do envelope. Duarte dos Santos e colaboradores (38) e Galler e colaboradores (39) descreveram 48 alterações nucleotídicas entre as subamostras 17D-213/77 e 17DD quando comparadas à

amostra parental virulenta Asibi e 21 alterações com relação à Asibi e 17D-204, que são específicas da 17DD. Em um trabalho desenvolvido para investigar o envolvimento da proteína E como base molecular da atenuação do vírus amarílico, utilizando painéis de anticorpos monoclonais (mAbs) específicos para vírus selvagem e amostra vacinal 17D, foi observado que o ganho de epítomos na proteína do envelope vacinal e a perda de outros no vírus selvagem estão diretamente envolvidos no processo de atenuação do vírus da febre amarela e sugere que os genes que codificam a proteína do envelope estão envolvidos na patogenicidade do vírus (52). Entretanto, ainda não foi possível identificar quais alterações de nucleotídeos e/ou aminoácidos são responsáveis pela atenuação do vírus vacinal (51,52).

Existem numerosos trabalhos, sendo alguns contraditórios, nos quais se utilizam anticorpos monoclonais que reconhecem epítomos de proteínas do envelope viral. Barrett e colaboradores (53), Leder e colaboradores (54) observaram diferenças antigênicas em vacinas fabricadas em diferentes centros. Por outro lado, Jennings e colaboradores (55), comparando a vacina febre amarela amostra 17DD produzida em Senegal e outras vacinas produzidas por outros centros, 17D-204 da “American Type Culture Collection” (ATCC), 17D-204 da OMS, 17DD do Brasil, FNV e a amostra Asibi selvagem, encontraram um alto grau de homologia (99,5 % e 99,5% para nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente) a nível molecular da porção do genoma que codifica proteínas estruturais, apesar de diferentes passagens em laboratórios distintos (55). Em adição, um trabalho recente demonstrou altos níveis de estabilidade genética, com mínima variabilidade interlotes em vacinas disponíveis comercialmente, quando produzidas em escala industrial (56).

1.6 A imunidade induzida pela vacina 17D

1.6.1 A resposta humoral

Diferentes estudos demonstraram que anticorpos protetores, correlacionados experimentalmente com resistência à infecção, podem ser detectados no 7º dia após a vacinação por testes de neutralização e, no 12º dia, em títulos menores, por teste de inibição de hemaglutinação. Após a primovacinação,

uma viremia transiente (2 a 3 dias) e em níveis baixos (não excedendo $2 \log_{10}$ PFU ou <200 PFU/mL) é detectada em aproximadamente 50% dos indivíduos vacinados, com picos entre o terceiro e sétimo dias, com resolução precedendo o aparecimento de anticorpos anti-IgM e anticorpos neutralizantes em níveis protetores (57-61). Os anticorpos do tipo IgM podem ser detectados no 8º ou 9º dia, aumentando até 14-17 dias após a infecção, diminuindo em seguida e permanecendo detectáveis por 2 a 3 meses. Nas primeiras 4 a 6 semanas, os títulos de anticorpos IgM são, em média, 16 a 256 vezes mais altos do que os títulos de anticorpos IgG. Estes e IgA surgem na segunda ou terceira semana após a vacinação e persistem por tempo prolongado (31,57-59).

O vírus da febre amarela possui determinantes antigênicos comuns a outros membros da família Flaviridae. Há evidências experimentais de que a resposta imunológica aos vírus da vacina contra febre amarela pode ser modificada pela infecção por outros vírus da mesma família (62,63) e de que os testes sorológicos para estas arboviroses estejam sujeitos a reações cruzadas (64-66). Todavia, estudos sobre a interferência dos vírus da dengue e o vírus da amostra 17D em humanos são controversos. Em um estudo realizado em 1962 foi observado um aumento da intensidade na resposta com anticorpos neutralizantes após a injeção subcutânea de vacina 17D, maior entre os indivíduos que não tinham anticorpos heterólogos (67). Resultados diferentes foram observados em outro trabalho, no qual a presença de anticorpos fixadores de complemento contra vírus sorologicamente relacionados à febre amarela interferiam na resposta imunológica à vacina 17D (68).

1.6.2 A resposta celular

Embora a imunidade conferida pela vacinação, baseada no estabelecimento de resposta humoral protetora, possua caráter inquestionável (69), somente nos últimos anos os mecanismos da resposta imune-celular relacionados ao estabelecimento da proteção têm sido mais investigados. Paralelamente a viremia, o número percentual de células $CD8^+$ aumenta significativamente com pico no 5º dia após a primovacinação, sugerindo a capacidade do processo vacinal de promover, paralelo à imunidade humoral, uma resposta imune celular importante (58). Parâmetros iniciais da ativação imune, tais como aumento sérico de

neopterin, β 2-microglobulina, proteína C reativa, IL-6, TNF- α e IL-1Ra têm sido descritos entre 2º e 7º dia após a vacinação (58,59,70,71). A indução de interferons é indicada pelo aumento da atividade da enzima 2',5'-oligoadenilato sintetase em linfócitos T e B com pico no 9º dia após a primovacinação (72). Células TCD8⁺ citotóxicas específicas contra epítomos de proteína não estrutural NS3 foram inicialmente demonstradas em camundongos (73,74). Em seres humanos, células TCD8⁺ citotóxicas específicas contra epítomos de proteínas não estruturais NS1, NS2b, NS3 e estruturais E do vírus vacinal 17D foram identificadas e demonstradas através da síntese de IFN- γ por ensaio ELISPOT 14 dias após a vacinação, podendo ser detectada até após 19 meses (75). Uma resposta de célula TCD8⁺ de memória ampla e polifuncional também tem sido descrita (76-78).

Estudos recentes têm demonstrado o papel crucial do sistema imune inato na extensão e qualidade da resposta imune adaptativa (79,80). O vírus vacinal 17D e o vírus selvagem são capazes de replicar em monócitos e macrófagos humanos, incluindo células de Kupffer (81-83). Em células dendríticas humanas, o vírus 17D é capaz de replicar, embora minimamente, sem causar morte por apoptose (84). Esta replicação é suficiente a apresentação de epítomos endógenos e recombinantes às células T (84,85) e estimula os receptores "Toll-like" (TLR) 2, 7, 8, e 9 (86,87) resultando na produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias IP-10 (CXCL10), interleucina (IL)-1 α , IL-1 β e TNF- α induz uma resposta de interferon do tipo I (IFN- α/β), com maturação e ativação de células dendríticas no sangue periférico. Acredita-se que essas células dendríticas ativadas provavelmente migram para os linfonodos regionais onde estimulam a resposta imune mediada por células e a humoral (78,84-90). A interação do vírus com diferentes TLRs modificariam o balanço de citocinas Th1 e Th2 produzido pelas células ativadas e é possível que os componentes não virais da vacina, também, possam influenciar neste equilíbrio (88,89). Esta imunidade induzida pela vacina 17D, envolvendo ambas as respostas imune, inata e adaptativa, as quais são orquestradas por fatores de transcrição importantes, dentre os quais STAT1, IRF7 e ETS2 tem sido demonstrada, mais recentemente, por meio do emprego da biologia de sistemas (89,91) sendo possível até identificar genes, que quando ativados, se mostram preditores de resposta de células TCD8⁺ (C1qB e ETIF2ak4) ou de resposta com produção de anticorpos neutralizantes (TNFRSF17) (92).

Apesar das importantes descobertas empregando a vacina anti-amarela 17D-204, somente na última década, estudos têm focalizado a resposta celular à

vacinação induzida pela vacina antiamarílica 17DD. Santos e colaboradores (93) demonstraram um aumento da população de células T CD3⁺ circulantes, e subpopulações TCD3⁺CD4⁺ (43% CD45RO⁺) e TCD3⁺CD8⁺ (70% CD45RO⁺) após a primovacinação com a vacina 17DD. Uma ativação dos linfócitos TCD8⁺, também, pôde ser caracterizada por um aumento de células TCD8⁺CD38⁺. Martins e colaboradores (94) demonstraram, em estudo imunofenotípico de leucócitos circulantes de adultos primovacinados, eventos ativadores e moduladores da resposta imune, iniciando precocemente e mantendo-se pelo menos por 30 dias. Esta resposta foi caracterizada por um aumento significativo de células T ativadas (CD4⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD69⁺), paralelamente à diminuição na frequência de células T reguladoras (CD4⁺CD25^{High+}) e células CD8⁺CD62L⁺ observadas no 7º dia pós-vacinação. Por outro lado, no 15º dia, observou-se um aumento da expressão da molécula imunorreguladora IL-10R em linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺. O aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ no dia 30 pós-vacinação sugere uma cinética distinta na ativação de células T, com células T CD4⁺ sendo ativadas precocemente, enquanto células T CD8⁺ representariam um evento mais tardio da resposta seguida vacinação antiamarílica 17DD (95). Em relação às células B, foi observado um decréscimo na frequência de linfócitos B no 7º dia com mudanças fenotípicas importantes no 15º dia, caracterizadas por aumento de linfócitos B ativados (CD69⁺) paralelamente ao aumento da expressão do receptor para IL-10 e da molécula reguladora CD32 nestas células. Em relação à imunidade inata, foi demonstrado que a ativação celular na população de neutrófilos ocorre mais precocemente no 7º e 15º dias com aumento da frequência de neutrófilos CD28⁺ (95). Resultados similares foram observados na população de monócitos, com expansão de uma população celular com características fenotípicas similares a macrófagos, monócitos ativados e pró-inflamatórios ocorrendo no 7º dia pós-vacinação. Simultaneamente aos eventos de ativação, o aparecimento de fenótipos celulares associados a eventos imunorreguladores, como elevada expressão de CD16 em neutrófilos, CD32 e CD64 em monócitos, aparecem como características marcantes no 7º dia pós-vacinação. Além disso, o aumento na expressão de receptor de interleucina 10 (IL-10R) por neutrófilos, monócitos e células NK no 15º dia, acompanhados pela elevada expressão de CD16 em monócitos também no 15º dia, representam eventos imunorreguladores adicionais. Estes dados demonstram a coexistência de aspectos fenotípicos associados a eventos de ativação e vias imunorreguladoras que parecem ser relevantes para a prevenção de eventos

adversos graves associados à vacinação antiamarílica, os quais, muitas vezes fatais, têm sido relatados na literatura científica (96).

A análise de citocinas intracitoplasmáticas demonstrou uma resposta imune com perfil misto de produção de citocinas inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-12) e moduladoras (IL-5 e IL-10) por células da imunidade inata e adaptativa após a vacinação (97). Santos e colaboradores (98) também demonstraram resposta mista de citocinas (aumento de IFN- γ e IL-4) 15 dias após imunização (98). O status das células NK na resposta imune à vacinação antiamarílica 17DD foi investigado, recentemente, por Neves e colaboradores, e foi demonstrado um aumento da expressão de TLR3 e TLR9 paralelamente a uma ativação precoce destas células, precocemente no dia 2 (embora não significativo) e significativos nos dias 4 e 7 após a vacinação (87).

1.7 Eficácia vacinal

A vacina contra febre amarela 17D tem-se mostrado imunogênica desde os primeiros estudos de campo e sua eficácia comprovada através da interrupção de epidemias de febre amarela e pela presença de anticorpos neutralizantes em 90% e 99% das pessoas adultas 10 e 30 dias após a vacinação, respectivamente. As taxas de soroconversão são semelhantes para as vacinas 17DD e 17D-204 (36,99,100). A resposta primária à vacina 17D com anticorpos neutralizantes é rápida (detectável 7 dias após a vacinação) e altamente específica. A soroproteção é definida como a presença de anticorpos neutralizantes em títulos $> 1:10$ ou “Log Neutralization Index” (LNI) $> 0,7$ (101,102). A eficácia da vacina tem sido atribuída ao desenvolvimento e fixação de anticorpos à proteína estrutural E, induzindo a neutralização de atividades biológicas, hemaglutinação passiva e proteção (103). Embora alguns estudos tenham demonstrado a presença de anticorpos neutralizantes por até 35 anos após a vacinação (104), a OMS preconiza revacinação a cada dez anos (1,3,21). Entretanto, as taxas de soroconversão em crianças menores de 2 anos são mais baixas e a evidência de que possa ser administrada simultaneamente com outras vacinas do PNI ainda é controversa (105-111). As causas para a baixa taxa de soroconversão em crianças precisam ser investigadas. A recomendação da OMS para vacinação de crianças aos nove meses de idade, concomitantemente à vacinação antissarampo, é embasada pelo custo-efetividade maior desta estratégia

de que às campanhas de vacinação para controle de surtos (46). Em estudo de campo recente de caráter multicêntrico, a vacina da subamostra 17DD alcançou níveis de soroconversão de 97% em indivíduos com idades de 10 anos ou mais, 94% nas crianças de 2 a 9 anos, 88% nas crianças de 12 a 23 meses, 72% nas de 9-11 meses e 82% nas de 6-8 meses (111). Em outro estudo, envolvendo lactentes de 9 a 11 meses no estado de São Paulo, a soroconversão foi de 77,5% (110), com indicação da associação da baixa soroconversão e menor intensidade da resposta imunológica com a aplicação simultânea da vacina de sarampo.

1.8 Segurança vacinal

Embora a vacina antiamarílica, amostra 17D, constitui-se em uma das mais seguras e eficazes vacinas de vírus vivo atenuados existentes e seja bem tolerada, eventos adversos associados à sua aplicação podem ocorrer, sendo as manifestações mais comuns: dor local, mal-estar, cefaléia, dores musculares e febre baixa, o que ocorre em 2% a 5% dos vacinados, por volta do 5º ao 10º dia vacinação (1,3,21). Essas reações duram de 1 a 2 dias e são, na maioria das vezes, brandas e com evolução favorável espontânea. Reações de hipersensibilidade imediata, como erupção, urticária, angioedema e choque anafilático, podem ocorrer de 30 minutos até 2 horas após a administração da vacina, porém são incomuns (incidência <1/1 milhão) sendo mais frequentes em pessoas com histórico de alergia a proteínas do ovo (113). Porém, a partir de 1996, eventos adversos graves (EAG) e até mesmo fatais vêm sendo relatados em indivíduos previamente saudáveis, fato que reivindica uma revisão crítica dos efeitos da primovacinação e dos fatores de risco envolvidos na revacinação (114-130). Considera-se como eventos adversos graves pós-vacinação contra febre amarela as reações de hipersensibilidade imediata (RH), a doença viscerotrópica (DV), a doença neurológica (DN) e qualquer morte súbita inesperada, ocorrendo até 30 dias após o término de campanhas de vacinação contra febre amarela em que as circunstâncias e dados clínicos sugerem uma reação adversa à vacina. A doença neurológica é um evento grave, mas raramente fatal, que manifesta como síndromes clínicas distintas decorrentes da ação direta do vírus vacinal no sistema nervoso central (meningoencefalite) ou manifestações autoimunes em que anticorpos e/ou células T ativadas induzidos pela vacina reagem com epítopos neuronais, ocasionando lesões no sistema nervoso central ou periférico, dentre as quais podem ser citadas a síndrome de Guillain-Barré (SGB); a

encefalomielite disseminada aguda (EMDA); a paralisia bulbar e a paralisia de Bell (1,3,21). Historicamente a doença neurológica esteve associada à vacinação de crianças. Dados da OMS (1994) apresentam mais de 200 milhões de vacinas aplicadas com a descrição de 17 casos de encefalites temporalmente associados à vacina (4 casos em crianças menores de 4 meses). Porém, relatos mais recentes da doença foram descritos em pessoas de todas as idades. O aparecimento da doença varia, nos casos documentados, entre 3-28 dias após a vacinação, e quase todos os casos foram em indivíduos primovacinaes e raramente fatais (<5%) (1,3,21,113). A incidência de doença neurológica associada à vacina antiamarílica nos Estados Unidos é de 0,8/100.000 doses administradas. A taxa é maior em pessoas ≥ 60 anos de idade, com uma taxa de 1,6/100.000 doses em pessoas entre 60-69 anos de idade e 2,3/100.000 doses em pessoas ≥ 70 anos de idade (1,21). No entanto o evento adverso, temporalmente associado à vacinação antiamarílica, considerado mais grave e com maior letalidade é a doença viscerotrópica (DV). Trata-se de doença grave, similar à doença de tipo selvagem, na qual ocorre a disseminação do vírus vacinal para diversos órgãos e, muitas vezes, levando à falência de múltiplos órgãos e morte. O início dos sintomas varia em média de 35 dias (1 a 8 dias) após a vacinação e apresenta uma taxa de letalidade de 53%. Nos Estados Unidos, a taxa de incidência é de 0,4 casos por 100.000 doses da vacina aplicada. A taxa é maior em pessoas ≥ 60 anos de idade, com taxa de 1/100.000 doses em pessoas de 60-69 anos de idade e 2,3/100.000 doses em idosos ≥ 70 anos de idade (1,21). Desde que foram publicados os primeiros casos de EAG em 1996, até fevereiro de 2010, foram notificados ao CDC, 57 casos de 14 países: Austrália, Bélgica, Brasil, China, Colômbia, Equador, França, Alemanha, Japão, Peru, Espanha, Suíça, Reino Unido e Estados Unidos (131), incluindo os cinco casos ocorridos no Peru em 2008 (124,125). A doença viscerotrópica associada à vacina antiamarílica era considerada um fenômeno recente até que Engel (120) e colaboradores relataram um caso ocorrido em uma mulher brasileira vacinada em 1975. Em 2010 mais 2 casos ocorridos em 1973 e 1978 foram descritos (128).

No Brasil, tem sido observado maior risco de ocorrência de evento adverso grave em áreas onde não há recomendação de vacina na rotina. Pelos registros do Sistema Nacional de Vigilância de Eventos Adversos Pós-Vacinaes do Ministério da Saúde, de 2000 a 2008, foram aplicadas 101.564.083 doses da vacina antiamarílica, tendo sido registradas reações de hipersensibilidade com uma frequência de 0,9/100.000 doses, das quais 0,023/100.000 doses representaram

choque anafilático. A frequência de doença neurológica associada à vacinação antiamarílica (DN) no mesmo período foi 0,084/100.000 doses. De 1999 a 2009, a frequência de doença viscerotrópica (DV) por doses administradas foi 0,019/100.000. Dentre os 26 casos de DV notificados (21 do Brasil e 5 de outros países), 19 foram classificados como casos confirmados, 4 como casos prováveis e 3 como casos suspeitos, envolvendo 10 pacientes do sexo masculino, 15 do sexo feminino e um com sexo desconhecido - um caso de 1975. A taxa de letalidade foi de 92.3% (127). Dos casos anteriores ocorridos no Brasil, 4 foram associados a lotes diferentes da vacina antiamarílica 17DD (114,132) que foram administrados durante um período de imunização em massa, no qual 22 milhões de pessoas foram vacinadas. Com o aumento do uso da vacina na reemergência do vírus da febre amarela nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul foram registrados, no estado de São Paulo, em 2009, 3 casos confirmados e 2 casos prováveis de DV para 1.600.000 doses administradas (0,31/100.000 doses). No estado do Rio Grande do Sul, na mesma data, foram notificados 2 casos confirmados e 2 casos prováveis de DV em 3.600.000 de doses aplicadas (0,11/100.000 doses) e 35 casos confirmados de meningite asséptica (0,97/100.000 doses) e 2 casos de SGB (0,06/100.000 doses). A incidência total de casos neurológicos foi, entretanto, de 1,1/100.000 doses. No Rio Grande do Sul foi notificado, também, um caso de doença desmielinizante com neurite óptica confirmada e 2 casos de encefalite devido à transmissão do vírus vacinal pelo aleitamento materno em recém nascidos de amamentação exclusiva, após a administração da vacina em suas mães (127,133).

Muitos dos eventos relatados após a vacinação contra febre amarela constituem-se em sinais e/ou sintomas de diversas doenças frequentes na população, assim nem sempre é possível distinguir os que são causados pela vacina e aqueles causados por outros problemas coincidentes temporalmente. Algumas situações têm sido identificadas como de maior risco para eventos adversos graves após a vacinação contra FA, tais como, pessoas portadoras de doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, e primovacinação em idosos com mais de 70 anos de idade. Acredita-se que fatores de predisposição individual, embora desconhecidos, sejam importantes, pois não se encontraram mutações nos vírus (134-136) ou problemas relacionados à qualidade das vacinas (1,3,113). Resposta adaptativa antígeno-específica robusta, envolvendo células T e B, anormalidades na resposta inata, principalmente com ruptura do eixo de ativação de monócitos,

aumento quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, MCP-1, MIG/CXCL e GRO) e polimorfismo nos genes do CCR5 e RANTES são algumas alterações descritas em casos de DV (137-139).

Apesar de muitos estudos, a compreensão dos fatores envolvidos na geração de uma resposta imunológica eficaz e os mecanismos responsáveis pelos eventos adversos graves ainda não foram elucidados. E, considerando a escassez de estudos que abordam aspectos detalhados da resposta imune em crianças, aliado ao fato de que a vacina contra febre amarela foi incluída no Calendário Básico de Vacinação do PNI do ministério da saúde, chama a atenção para a necessidade de uma revisão crítica dos efeitos da vacinação e realização de estudos adicionais para avaliar os aspectos da resposta imune no âmbito da memória imunológica pós-vacinal.

Desta forma, considerando a necessidade de ampliar a compreensão dos fenômenos da resposta imune induzida pela vacinação anti-amarela, este projeto propõe avaliar o panorama da resposta imune vacinal, utilizando uma nova estratégia proposta por Vitelli-Avelar e colaboradores (140), a partir de um conceito de baixa e alta produção de citocinas criado por Bahia-Oliveira (141). Esse modelo permite avaliar de forma mais completa o perfil dominante de citocinas produzidas por populações e subpopulações de leucócitos circulantes, tanto individualmente quanto no âmbito de grupos previamente selecionados. A análise do perfil de citocinas, tanto no contexto *ex vivo* como após estimulação *in vitro* com antígenos da vacina anti-amarela, oferecerá evidências adicionais sobre os eventos imunológicos pós-vacinação relevantes para a caracterização e entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na imunidade anti-amarela, de crianças e adultos primovacinados/revacinados, proporcionando, assim, uma melhor compreensão da resposta imune celular ao vírus vacinal e contribuindo para estudos futuros acerca da proteção desencadeada por vacinas.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Atualizar o conhecimento científico acerca da imunidade vacinal ativa contra a febre amarela (17DD), através da investigação minuciosa de parâmetros fenotípicos celulares e moleculares dos eventos pós-vacinais.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o impacto do antígeno amarelo 17DD no panorama de citocinas em leucócitos circulantes, na cinética da resposta imune em adultos primovacinados;

Avaliar as alterações no padrão fenotípico de leucócitos circulantes e no perfil de quimiocinas/citocinas plasmáticas em casos de eventos adversos graves pós-vacinação anti-amarela;

Caracterizar o índice de impacto do antígeno amarelo 17DD no panorama de citocinas em leucócitos circulantes, associado aos diferentes padrões de soroconversão em crianças.

3 MÉTODOS

3.1 Grupos de estudo e amostras biológicas

3.1.1 Estudo em adultos

Para a realização do estudo longitudinal dos estágios iniciais da resposta vacinal em adultos foram inicialmente avaliados 50 indivíduos adultos com idade variando entre 21 e 51 anos, residentes na região metropolitana de Belo Horizonte MG, que se apresentaram voluntariamente ao chamado colocado em alguns meios de comunicação de massa, onde eram convocados indivíduos adultos saudáveis, sem história prévia de vacinação antiamarílica que desejassem participar da presente pesquisa. Os voluntários que apresentaram resultado negativo ao teste de quantificação de anticorpos neutralizantes pelo teste de redução de placas de lise em células VERO (PRNT) foram selecionados para este estudo, sendo um total de 10 indivíduos, 6 do sexo masculino e 4 do sexo feminino, com idade variando entre 21 e 51 anos. Os voluntários selecionados foram submetidos à vacinação antiamarílica em Centros de Saúde da Rede Pública de Belo Horizonte, sob a supervisão do Dr. José Geraldo Leite Ribeiro, da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (SESMG). Nenhum dos voluntários apresentou qualquer manifestação sugestiva de reação adversa temporalmente associada à vacinação antiamarílica 17DD. As amostras de sangue foram coletadas por profissionais qualificados do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR/Fiocruz), em quatro tempos distintos, pré-vacinal, 7, 15 e 30 dias após a vacinação, por punção venosa através do sistema de coleta a vácuo (Vacutainer, Becton Dickinson - BD) em três frascos separados, sendo um frasco de 5 mL contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), um frasco de 10 mL contendo heparina sódica e um frasco de 10 mL sem anticoagulante. O sangue coletado em EDTA foi utilizado para a realização de hemograma e estudo do perfil imunofenotípico de leucócitos periféricos. O sangue coletado em heparina foi utilizado nos ensaios de detecção de citocinas intracitoplasmáticas e o material coletado sem anticoagulante foi destinado à realização dos testes de soroneutralização.

3.1.2 Estudo em casos de reações adversas

Seguindo o fluxograma proposto no protocolo de orientação frente a eventos adversos graves associados temporalmente à vacina 17DD contra febre amarela, do Ministério da Saúde (113), foi colhida por punção venosa através do sistema de coleta a vácuo (Vacutainer, BD) uma amostra de 7 mL de sangue periférico em heparina, de uma paciente estadunidense, de 23 anos de idade, que recebeu a vacina 17D-204, em Chicago nos Estados Unidos, como preparação para sua viagem ao Brasil e que apresentou quadro clínico com características sugestivas de evento adverso à vacinação anti-amarílica (129). A amostra de sangue periférico foi colhida 15 dias após a vacinação, quando a paciente já se encontrava na cidade do Rio de Janeiro, RJ, Brasil e foi encaminhada ao Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou.

3.1.3 Estudo em crianças

Para o estudo do impacto do antígeno amarílico 17DD no panorama de citocinas em leucócitos circulantes associado aos diferentes padrões de soroconversão em crianças foram selecionados voluntários de ambos os sexos, com idade entre 9 e 47 meses, os quais participavam de estudo multicêntrico envolvendo o Estado de Minas Gerais e o Distrito Federal (142). As amostras de sangue periférico (4 mL) foram coletadas por punção venosa através do sistema de coleta a vácuo (Vacutainer, BD) em 3 tempos distintos: 30 dias após a primovacinação, para quantificação dos anticorpos anti-amarílicos e 1 ano após a primo e/ou revacinação para o estudo do impacto do antígeno amarílico 17DD no panorama de citocinas em leucócitos circulantes associado aos diferentes padrões de soroconversão. A soroconversão, aparecimento de anticorpos séricos induzidos pelo contato com o antígeno vacinal anti-amarílico, foi o desfecho primário de interesse para o estudo. Inicialmente, estas crianças foram classificadas de acordo com os níveis de anticorpos neutralizantes anti-amarílicos após a vacinação em: primovacinadas (PV) não respondedoras (PV-PRNT⁻) (PRNT < 2.5 Log₁₀ mUI/mL, n=10) e primovacinadas respondedoras (PV-PRNT⁺) (PRNT ≥ 2.5 Log₁₀ mUI/mL, n=30). O grupo respondedor PV-PRNT⁺ foi subdividido em PV-PRNT^{MEDIUM+} (2,5 ≤ PRNT ≤ 3,5 Log₁₀ mUI/mL, n=20)

e PV-PRNT^{HIGH+} (PRNT >3,5 Log₁₀ mUI/mL, n=10). Dez crianças seletivamente não respondedoras após a primovacinação foram submetidas à revacinação um ano após a primovacinação sendo denominadas (RV-PRNT⁺) (PRNT ≥2.5 Log₁₀ mUI/mL, n=10). E, um grupo de crianças inicialmente não vacinadas (soronegativas) foi denominado como não vacinado (NV-PRNT⁻) (PRNT <2.5 Log₁₀ mUI/ML, n=10). Todas as crianças se encaixaram nos critérios de elegibilidade e seus responsáveis legais permitiram a participação no estudo. Todo procedimento de identificação dos voluntários, vacinação e colheita das amostras sanguíneas, foi conduzido pela Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos (ASCLIN) sob a coordenação do Dr. Reinaldo Menezes (médico chefe), da Dra. Maria de Lourdes Maia (médica supervisora de estudos clínicos), do Dr. Luiz Camacho da Escola Nacional de Saúde Pública da Fiocruz, do Dr. José Geraldo Leite Ribeiro (Setor de Imunizações) da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais e da Dra. Ivone Perez da Secretaria de Saúde do Distrito Federal.

3.1.4 Lote da vacina antiamarílica

Os lotes da vacina antiamarílica 17DD utilizados, no estudo longitudinal em adultos foi o 055VFA054P e no estudo da resposta vacinal em crianças foi o 007VFA010Z. Ambos derivados do lote semente de trabalho 993FB013Z (passagem nº 287) da subamostra 17DD produzido em 1999 e utilizado na produção de todos os lotes de vacina desde 2002. A vacina antiamarílica 17DD é produzida por Bio-Manguinhos a partir da amostra de vírus atenuados, cultivados em embriões de galinha, livres de agentes patogênicos SPF (Specific Pathogenic Free), de acordo com as normas estabelecidas pela OMS e são utilizadas em campanhas e na rotina de vacinação da rede pública de serviços de saúde. Cada dose de 0,5 mL da vacina é composta dos seguintes constituintes: Vírus 17DD febre amarela - 1.000 DL₅₀, sacarose, glutamato de sódio, sorbitol, gelatina bovina hidrolisada, eritromicina e canamicina (119).

A participação de todos os indivíduos nos estudos foi voluntária. Todos os participantes e/ou seus representantes legais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, anteriormente à sua inclusão no trabalho. É importante salientar que todo o estudo foi submetido e aprovado pelos comitês de ética da CPqRR/Fiocruz (protocolo 03/2002) e da Fundação Oswaldo Cruz (protocolo 236A/03).

3.2 Metodologias empregadas

3.2.1 Teste de soroneutralização

A quantificação de anticorpos neutralizantes pelo teste de redução de placas de lise em células VERO (PRNT) (144), do estudo longitudinal em adultos, foi realizada no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, por Juliana Prado sob a supervisão da Dra. Erna Geessien Kroon.

A quantificação de anticorpos neutralizantes (PRNT) do estudo das crianças foi realizada no Laboratório de Vírus de Bio-Manguinhos (LATEV/Fiocruz do Rio de Janeiro) sob a coordenação do Dr. Luis Antônio Camacho, segundo a metodologia descrita por Stefano e colaboradores modificada (110). O PRNT é considerado o teste mais sensível e mais específico para febre amarela (102,145) produzindo resultados quantitativos (em Unidades Internacionais) que se correlacionam com proteção.

3.2.2 Análise imunofenotípica

Os ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram realizados segundo o protocolo proposto pelo fabricante, com pequenas modificações conforme descrito a seguir: em tubos de poliestireno 12x75 mm foram adicionados 5 µl do anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse, marcado com fluorocromo (Tabela 1). Combinações específicas de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos distintos foram utilizadas para a análise simultânea de marcadores de superfície celular necessários para a caracterização de subpopulações celulares de interesse. Para cada combinação de anticorpos monoclonais foram adicionadas alíquotas 100 µl de sangue periférico total coletado em EDTA. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, procedeu-se a lise dos eritrócitos, utilizando 2 mL de solução de lise comercial (FACS™ Lysing Solution - BD Biosciences, San Jose, Califórnia, USA) diluída 10 vezes em água destilada. Após nova homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e então

submetidas à centrifugação (400g, 10 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com 2 mL de “phosphate-buffered saline”-PBS (0,015M pH 7,4), empregando as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Numa etapa final, os leucócitos foram fixados com 300 µl de solução fixadora – MFF (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/l de cloreto de sódio, pH 7,2). A aquisição dos dados (10.000 eventos) e a análise dos resultados foram realizadas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™, utilizando o “software” CellQuest™. Os dados obtidos através da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram analisados segundo descrito por Martins em 2004 (94), utilizando-se estratégias diferentes com o uso dos recursos múltiplos do programa CELLQuest™, denominadas como análise convencional, análise do marcador CD56 em subpopulações de células CD3⁻CD16⁺, análise de subpopulações de células CD3⁻CD56⁺, análise de células NKT (CD3⁺CD56⁺), análise de monócitos pró-inflamatórios, análise de células T reguladoras, análise combinada “gated”, análise semiquantitativa da expressão de FcγR em monócitos, análise da expressão de FcγRII em linfócitos B e análise da expressão de receptores de quimiocinas em leucócitos.

TABELA 1. Anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromos, utilizados para análise de populações, subpopulações celulares e moléculas de superfície.

Anticorpos anti	Fluoro-cromos	Clones	Células identificadas
CD3	FITC ou PE	UCHT1	Linfócitos T
CD4	FITC, PE ou TC	RPA-T4	Linfócitos T auxiliares
CD5	FITC	L17F12	Linfócitos B1
CD8	FITC/TC	RPA-T8	Linfócitos T citotóxicos
CD14	TC	Tük4	Monócitos
CD16	FITC/TC	3G8	Células NK, “Macrófagos-like”
CD18	FITC	YF118.3	Molécula de adesão de Linfócitos
CD19	TC	4G7, SJ25-C1	Linfócitos B
CD23	PE	M-L233	Molécula de ativação celular, receptor de baixa afinidade de IgE (FcεRII)

CD25	PE	3G10	Linfócitos T reguladores
CD28	FITC	15E8(CLB402)	Coreceptor de ativação de Linfócitos T
CD32	FITC	FLI8.26	Receptor de IgG em Linfócitos B e Monócitos
CD38	PE	AT13/5	Linfócitos T ativados
CD54	PE	15.2	Molécula de adesão de Linfócitos T
CD56	PE	B159	Células NK
CD62L	FITC	DREG-56	Molécula de adesão de Linfócitos T
CD64	FITC	10.1	Receptor de IgG em Monócitos
CD69	FITC	H1.2F3	Linfócitos T e B ativados
HLA-DR	PE	Tü36	Linfócitos T ativados e Monócitos pró-inflamatórios
IL-10R	PE	3F9	Receptor de IL-10 em Linfócitos T, B, NK e Monócitos
CCR2	BIOTINA	48607	Receptor de quimiocina em Linfócitos T (Tipo 0)
CCR3	FITC	61828.111	Receptor de quimiocina em Linfócitos T (Tipo 2)
CXCR3	FITC	49801	Receptor de quimiocina em Linfócitos T (Tipo 1) e Monócitos
CXCR4	FITC	1265	Receptor de quimiocina em Linfócitos T (Tipo 0)
CCR5	FITC	45531	Receptor de quimiocina em Linfócitos T (Tipo 1) e Monócitos

3.2.3 Microcultura de células de sangue periférico e marcação de superfície e de citocinas intracitoplasmáticas

Para avaliar a produção de citocinas por leucócitos circulantes, foi realizada microcultura de curta duração, na ausência de estimulação antigênica (cultura controle) e na presença de antígenos vacinais 17DD (cultura estimulada). A metodologia foi realizada como descrito por Peruhype-Magalhães e colaboradores (146) com modificações descritas a seguir: alíquotas de 500 µl de sangue periférico coletado a vácuo em tubos de 10 mL contendo heparina sódica foram adicionadas, em triplicata, em tubos de polipropileno de 14 mL, contendo 500 µl de RPMI-1640 e 50 µl de diluente de vacina, os quais foram identificados como cultura controle (não estimulada) e em triplicata, em tubos de polipropileno de 14 mL, contendo 500 µl de

RPMI-1640 e 50 μl de vacina 17DD (cultura estimulada); na concentração final de 10^6 partículas virais/mL, no estudo longitudinal em adultos e $2,5 \times 10^3$ partículas virais/mL, no estudo em crianças. As culturas foram incubadas em estufa de CO_2 com 5% de umidade, a 37°C (Forma Scientific), por 6 horas. Este tempo de incubação foi previamente determinado por estudos comparativos com diferentes tempos de incubação. Após o período de incubação, 10 μl de Brefeldina A (SIGMA 1mg/mL concentração final de 10 mg/mL) foram adicionados a todos os tubos de cultura. A utilização da Brefeldina A promove a retenção da citocina no complexo de Golgi, permitindo sua detecção no interior celular. As amostras foram submetidas a uma segunda incubação por 4 horas, em estufa de CO_2 com 5% de umidade, a 37°C . Após esta última incubação, 110 μL de EDTA (SIGMA) 20 mM, obtidos de uma solução estoque de 200 mM, diluída 1/10 (concentração final de 2 mM), foram adicionados diretamente às culturas. Este procedimento bloqueia eventual processo posterior de ativação das células e garante a obtenção de resultados padronizados. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Para a realização da marcação imunofenotípica e das citocinas intracitoplasmáticas, as amostras de sangue cultivadas, em triplicata, foram vertidas em um só tubo, no qual foi acrescentado 4 mL de PBS Wash (PBS 0,015M, pH 7,4 contendo 0,5% de albumina bovina sérica – BSA e 0,1% de azida sódica – reagentes SIGMA). As amostras foram centrifugadas a 400g, por 10 minutos, a 18°C . Após a centrifugação a suspensão de células foi distribuída em tubos de poliestireno 22x75mm previamente rotulados como tubo 1 (CD4 e CD8), tubo 2 (CD14), tubo 3 (CD16) e tubo 4 (CD19) contendo 20 μl anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos, conforme citado na Tabela 2, nos respectivos volumes de amostras: 200 μl , 100 μl , 100 μl e 100 μl . Após homogeneização em vórtex, as amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando 3 mL de solução de lise comercial (BD FACS™ Lysing Solution) por 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, as preparações celulares foram centrifugadas empregando as mesmas condições de centrifugação supracitadas, após a qual, as amostras foram permeabilizadas com 1 mL de PBS-W e 3 mL de PBS-permeabilizante (P) (PBS 0,015M, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina - reagentes SIGMA) por 10 minutos, à temperatura ambiente. A suspensão celular foi centrifugada a 400g, por 10 minutos, a 18°C , quando foi novamente lavada com PBS-W. Posteriormente, 30 μl das células

permeabilizadas foram incubadas em microplacas de 96 poços, de fundo em “U”, contendo 20 µl da respectiva solução de anticorpos anticitocinas marcados com Ficoeritrina (PE), a uma diluição de 1:100 em PBS-P (Tabela 3). As amostras foram novamente incubadas durante 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 150 µl de PBS-P e, em seguida, com 200 µl de PBS-W. Ao final, foram adicionados 200 µl de solução fixadora (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio e 6,67 g/l de cloreto de sódio, pH 7,2). As amostras contendo a suspensão celular a ser analisada foram transferidas para tubos de 500 µl (Thomas Laboratory Specialities) e, posteriormente, submetidas ao procedimento de aquisição de dados em citômetro de fluxo. A aquisição dos dados (30.000 eventos) e a análise dos resultados foram realizadas em citômetro de fluxo - BD FACScalibur™, utilizando o software do equipamento denominado CellQuest™.

TABELA 2. Anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromos, utilizados para análise de populações e subpopulações celulares da microcultura de sangue periférico.

Anticorpos monoclonais anti	Fluorocromos	Clones	Células identificadas
CD4	TC	RPA-T4	Linfócitos T auxiliares
CD8	FITC	RPA-T8	Linfócitos T supressores
CD14	TC	TüK4	Monócitos
CD16	FITC	3G8	Células NK, granulócitos
CD19	FITC/TC	4G7/SJ25-C1	Linfócitos B

TABELA 3. Anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromos, utilizados para identificação de citocinas intracitoplasmáticas em microcultura de sangue periférico.

Anticorpos anti	Fluorocromos	Clones
IFN- γ	PE	B27
TNF- α	PE	Mab11
IL-4	PE	MP4-25D2
IL-5	PE	TRFK5
IL-10	PE	JES3-9D7
IL-12	PE	C11.5.14

3.2.4 Análise dos níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas

A avaliação níveis plasmáticos das citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-23 e TGF- β) e das quimiocinas (CXCL8, CXCL24, CCL2, CCL3, CCL5) nos indivíduos adultos e no caso de reação adversa foi realizada utilizando-se kits comerciais de ELISA para IL-17 (Biosource, Nivelles, Belgium), IL-23 e TGF- β (Bender Medsystems, Vienna, Áustria) e para as demais citocinas/quimiocinas foi utilizado o ensaio com microesferas fluorescentes “Cytometric Bead Array” (CBA) - BD. A metodologia CBA – BD permite a avaliação simultânea de diversas citocinas/quimiocinas no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Assim, alíquotas de 25 μ l de plasma teste diluído 1:5 com diluente G (reagente presente no kit CBA), alíquotas de 25 μ l dos padrões de citocinas/quimiocinas, submetidos à diluição seriada com diluente G (“Top Standart” - 5000 pg/mL, 1:2 - 2500 pg/mL, 1:4 - 1250 pg/mL, 1:8 - 625 pg/mL, 1:16 - 312,5 pg/mL, 1:32 - 156 pg/mL, 1:64 - 80 pg/mL, 1:128 - 40 pg/mL e 1:256 - 20 pg/mL) e 25 mL de diluente G apenas (Controle Negativo), foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 15 mL da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-10 (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit), ou anti-IL-12, TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-1 β (Human Inflammation CBA Kit) ou anti-CCL2/MCP-1, CCL-

5/RANTES, CXCL-8/IL-8 e CXCL-10/IP-10 (Human Chemokine CBA Kit) com subsequente incubação por 90 minutos, à T.A., ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μ L da solução F (“Wash buffer”, reagente presente no kit CBA) e, o sobrenadante, cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram então reincubadas na presença de 20 μ l do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos anticitocinas ou quimiocinas humanas marcadas com PE, por 90 minutos, T.A., ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com 500 μ l da solução F e, o sobrenadante, cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram ressuspensas em 250 μ l de reagente F e um total de 1.800 eventos/região (R1) foram analisados no BD FACSCalibur™.

3.3 Estratégias de análises

3.3.1 Análise da população de neutrófilos

Como mostrado na Figura 4, o estudo da população de neutrófilos consistiu na identificação da população celular de interesse, neste caso a população de neutrófilos, através da construção de gráficos de anti-CD16 FITC e/ou anti-CD14/TC *versus* granulosidade, onde essa população celular apresenta distribuição característica (Figuras 4A e C). Após a seleção da região (R) de interesse, a mesma foi analisada utilizando-se a frequência de fluorescência (FL) apresentada pelas células presentes na região selecionada através de uma janela (R1), em gráficos pontuais de FL1/FITC *versus* FL2/PE (Figura 4B) e de FL3/TC *versus* FL2/PE (Figura 4D). Para análise das citocinas IFN- γ , IL-4 e TNF- α , os neutrófilos foram selecionados por suas características morfométricas e imunofenotípicas, através de gráficos de distribuição pontual de FL1/CD16 *versus* granulosidade celular - SSC (Figura 4A). Já para análise das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12, utilizando gráficos de FL3/CD14 *versus* granulosidade celular (SSC); sendo que para a citocina TNF- α , a média das frequências obtidas nas duas estratégias de análise.

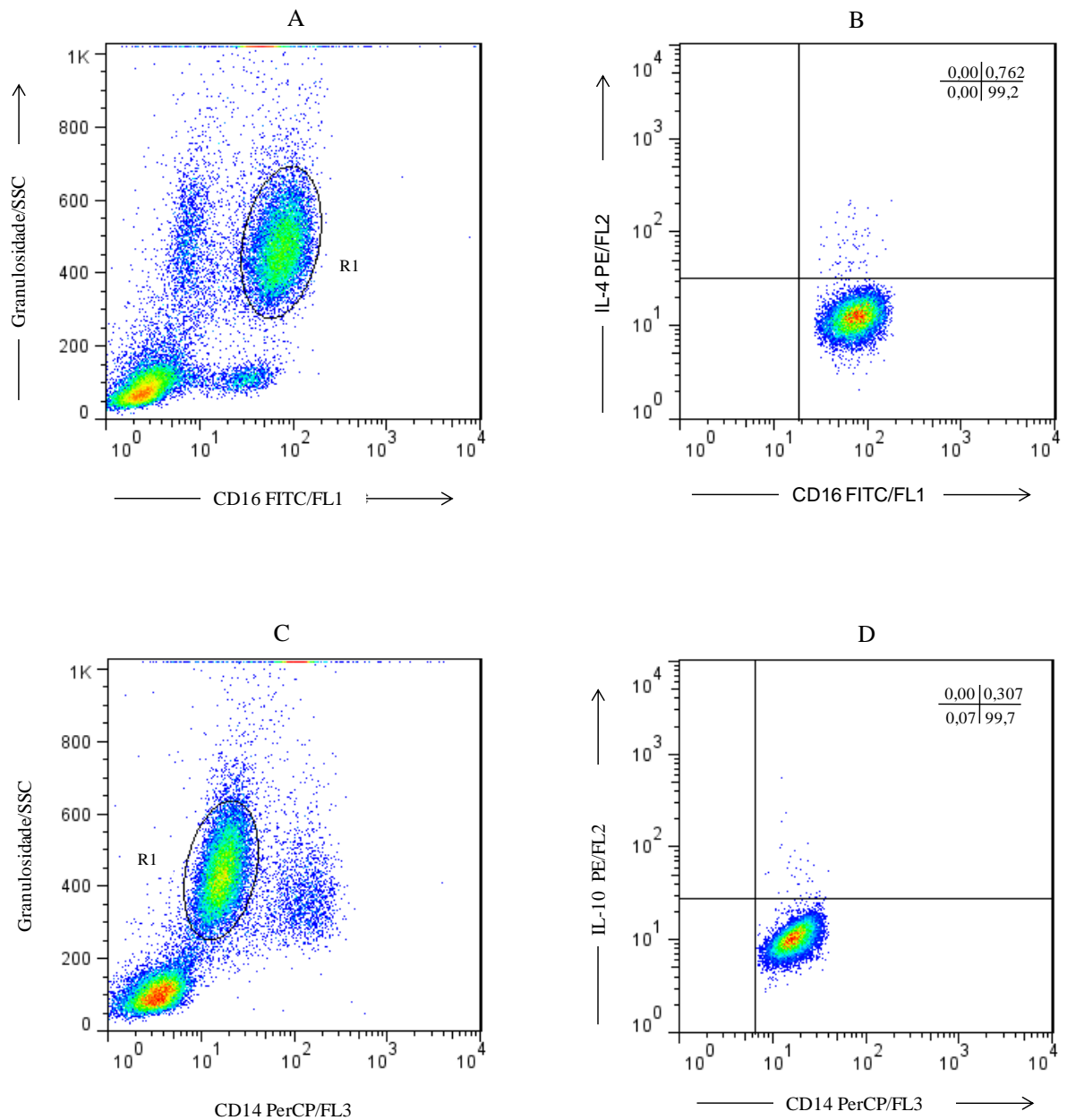


Figura 4: Perfil de análise de neutrófilos. A) Perfil de distribuição celular considerando o marcador fenotípico CD16/FITC *versus* granulidade celular. B) Perfil de distribuição celular considerando a fluorescência 1 (CD16/FITC) *versus* fluorescência 2 (IL-4/PE) da população selecionada na janela R1 do gráfico A. C) Perfil de distribuição celular considerando o marcador fenotípico CD14/TC *versus* granulidade celular. D) Perfil de distribuição celular considerando a fluorescência 3 (CD14/TC) *versus* fluorescência 2 (IL-10/PE) da população selecionada na janela R1 do gráfico C.

3.3.2 Análise da população de monócitos

Para análise de monócitos, foi construído um gráfico de fluorescência 3 (TC) para o marcador fenotípico CD14 *versus* a granulosidade celular. A população analisada foi aquela fortemente positiva para esse fenótipo celular, sendo delimitada por meio de uma janela no gráfico. No exemplo, a janela foi posicionada nas células que apresentaram alta expressão do marcador CD14 (Figura 5A). Através dessa abordagem, pode-se obter uma população homogênea e bem diferenciada das demais, não só facilitando a seleção da população de interesse, como também garantindo a sua identificação de forma segura e padronizada. No exemplo apresentado na Figura 5B temos a avaliação da citocina TNF- α produzida por esta população em um gráfico de fluorescência 3 (anti-CD14/TC) *versus* fluorescência 2 (anti-TNF- α /PE).

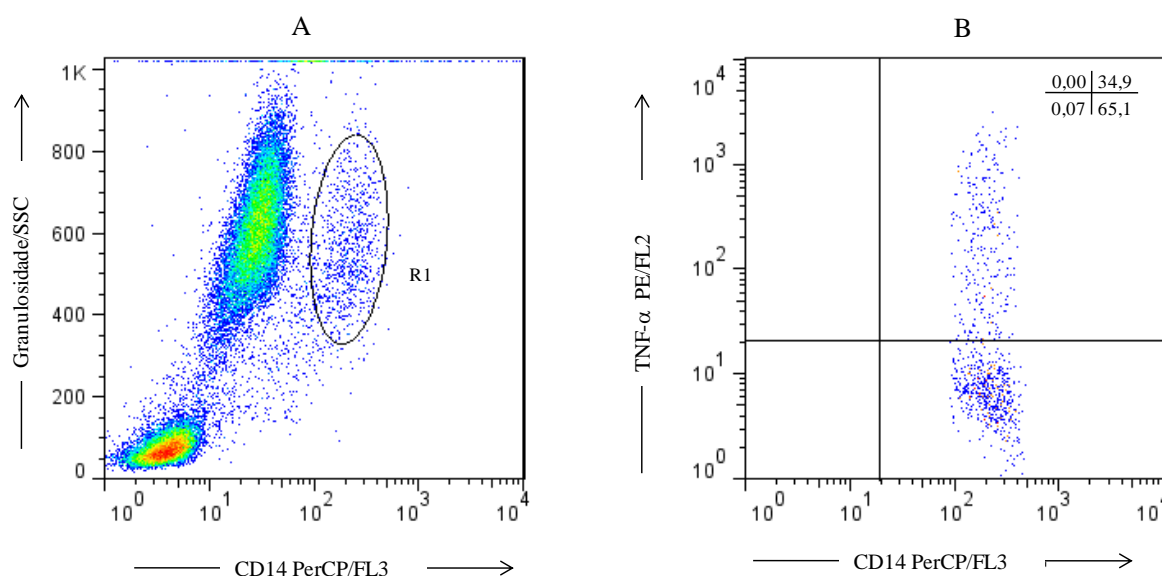


Figura 5: Perfil de análise de monócitos. A) Perfil de distribuição celular considerando o marcador fenotípico CD14/TC *versus* granulosidade celular - uma abordagem específica utilizada para análise da população monocitária. B) Perfil de distribuição celular considerando a fluorescência 3 (CD14/TC) *versus* fluorescência 2 (TNF- α /PE) da população selecionada na janela R1 do gráfico A.

3.3.3 Análise da população de linfócitos

A Figura 6 mostra de forma esquemática a sequência de procedimentos necessários para a análise dos dados do fenótipo celular e perfil de citocinas

intracelulares. O primeiro passo consistiu na identificação, através das características morfométricas, das três diferentes populações de leucócitos em estudo: linfócitos, monócitos e neutrófilos. Para análise de linfócitos e células NK, foram utilizados gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* a granulosidade celular (SSC). Após a seleção da região de interesse por meio de uma janela no gráfico (R1), a frequência de fluorescência das células presentes nesta região foi analisada em gráficos pontuais de fluorescência 1 (FITC) *versus* fluorescência 2 (PE) e/ou de fluorescência 2 (PE) *versus* fluorescência 3 (TC). No exemplo apresentado na Figura 6B temos anti-CD8 FITC *versus* anti-IL-10 PE.

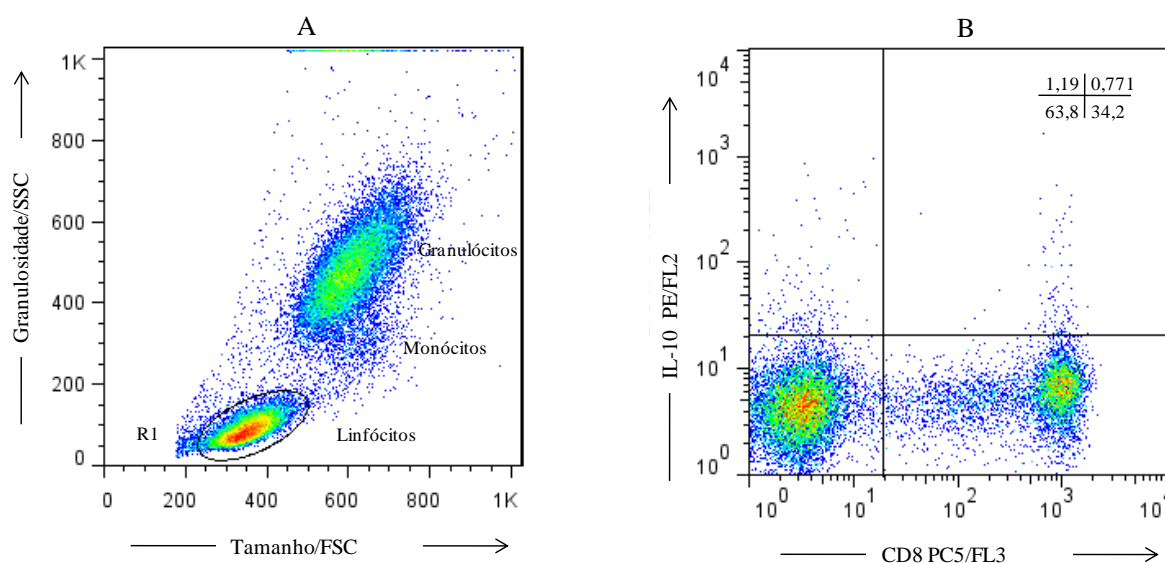


Figura 6: Ilustração da análise convencional de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular considerando o tamanho *versus* granulosidade celular. B) Perfil de distribuição celular considerando a fluorescência 1 (CD8/FITC) *versus* fluorescência 2 (IL-10/PE), da população selecionada na janela R1 do gráfico.

3.3.4 Análise do perfil panorâmico

3.3.4.1 Estudo em adultos

Segundo protocolo proposto por Vitelli-Avelar e colaboradores (140), a análise dos dados foi realizada utilizando-se o modelo panorâmico de análise imunofenotípica por citometria de fluxo. Para tanto, inicialmente o percentual de células citocinas⁺ para uma dada população celular foi empregado numa estratégia de análise que consiste de 5 etapas: 1ª - Cálculo da mediana global para cada

subpopulação de células citocinas⁺ foi considerado todo o conjunto de valores obtidos para os grupos inseridos no estudo; 2^a - Categorização de baixo e alto-produtores de citocinas para cada subpopulação celular a mediana global de células citocinas⁺ foi utilizada como o ponto de corte para identificar indivíduos baixo (\leq mediana global) e alto ($>$ mediana global) produtores de citocinas; 3^a - Compilação dos dados em diagramas, os dados referentes às categorias supracitadas foram compilados em diagramas, empregando cores específicas para designar baixo-produtores (□), alto-produtores de citocinas inflamatórias (■) e alto-produtores de citocinas reguladoras (▣) para cada subpopulação leucocitária avaliada; 4^a- Cálculo do balanço de citocinas para cada subpopulação de leucócitos, os dados obtidos nos diagramas da etapa anterior foram empregados para definir o balanço de citocinas para cada população celular, definindo quatro categorias, de acordo com o predomínio de baixo-produtores, alto-produtores de citocinas inflamatórias, alto-produtores de citocinas reguladoras e perfil misto (▤) que representa situações de equivalência entre alto-produtores de citocinas inflamatórias e reguladoras; 5^a - Estabelecimento do panorama de citocinas dos leucócitos circulantes foi calculado para a população total de leucócitos, o perfil global de citocinas representado pelo balanço de citocinas predominantes, compilando os perfis individuais inflamatórios, reguladores ou mistos de todas as subpopulações avaliadas.

3.3.4.2 Estudo em crianças

Para a análise dos dados do estudo em crianças, utilizando o modelo panorâmico de análise imunofenotípica, foi empregada a estratégia de análise em 6 etapas descritas a seguir: 1^a - Quantificação do percentual de células citocinas⁺ para cada população celular estudada, foi obtida por meio das análises dos dados adquiridos no citômetro de fluxo; 2^a - Cálculo do índice de impacto da estimulação antigênica 17DD *in vitro*, obtido por meio do cálculo da razão do valor percentual de células citocinas⁺ (etapa anterior) para uma dada população celular na cultura estimulada, pelo percentual de células citocinas⁺ para a mesma população celular na cultura controle (17DD/Controle); 3^a - Cálculo da mediana global do índice de impacto para cada população celular estudada, por meio do qual foi obtido o ponto de corte para segregar baixo e alto-produtores de citocinas; 4^a - Categorização de baixo-produtores e alto-produtores de citocinas utilizando a mediana global do índice de impacto obtida na etapa anterior; 5^a Compilação dos dados em diagramas com

todas as populações de leucócitos analisadas de cada indivíduo e cálculo da frequência de alto-produtores em cada grupo de estudo; 6ª - Determinação da assinatura de citocinas do grupo de crianças primovacinas respondedoras (PV-PRNT⁺) que foi utilizada como curva de referência para análise comparativa entre grupos. A curva foi obtida organizando o perfil de citocinas em curva ascendente de alto-produtores;

3.4 Análise estatística dos dados

A análise estatística da cinética dos diferentes tempos após vacinação antiamarílica 17DD dos voluntários adultos foi realizada utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, Califórnia). As análises foram feitas através do teste t pareado, comparando os dados de cada tempo entre si. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Wilcoxon. Independente da avaliação estatística empregada, os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$). As diferenças significativas estão identificadas pelas letras “a”, “b”, “c” e “d” para os dias 0, 7, 15 e 30, respectivamente.

Para avaliação do evento adverso após vacinação antiamarílica, os resultados foram comparados à média dos valores obtidos do grupo de estudo em voluntários adultos, 15 dias após a vacinação 17DD, na ausência de reações adversas (valor de referência). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores do evento adverso estavam fora dos valores de referência em ± 2 desvios padrões, identificado por (*). Além disso, foram considerados estatisticamente significativos os valores do evento adverso que era a metade ou o dobro do valor médio de referência, identificado por (**).

A análise estatística no estudo da resposta vacinal em crianças foi realizada através da análise de variância (ANOVA) para dados não paramétricos, Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's de comparações múltiplas. O teste de Spearman (r_s) foi utilizado para avaliar as correlações entre os grupos estudados e o teste Qui-quadrado foi utilizado para comparações das frequências de altos indexes de citocinas entre os grupos NV-PRNT⁻, PV-PRNT⁻, PV-PRNT⁺ e RV-PRNT⁺. Independente da avaliação estatística empregada, os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor ou igual a

0,05. Diferenças significativas são identificadas, nas figuras, pelas letras “a”, “b”, “c” e “d” para comparações entre NV-PRNT⁻, PV-PRNT⁻, PV-PRNT⁺ e RV-PRNT⁺, respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo 1

O artigo científico apresentado a seguir corresponde ao objetivo específico: Avaliar o impacto do antígeno amarelo 17DD no panorama de citocinas em leucócitos circulantes, na cinética da resposta imune em adultos primovacinados.

Título: Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults.

Autores: Silva ML, Martins MA, Espírito-Santo LR, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JGL, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Elói-Santos SM, Martins-Filho AO.

Revista: *Vaccine*. 2011;29:583-92.

DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.08.046



Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults

Maria Luiza Silva^{a,b}, Marina Angela Martins^{a,d}, Luçandra Ramos Espírito-Santo^{a,e}, Ana Carolina Campi-Azevedo^a, Denise Silveira-Lemos^a, José Geraldo Leite Ribeiro^f, Akira Homma^g, Erna Geessien Kroon^h, Andréa Teixeira-Carvalho^a, Silvana Maria Elói-Santos^{a,c}, Olindo Assis Martins-Filho^{a,*}

^a Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

^b Centro de Pós-graduação, Curso Patologia – Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

^c Departamento de Propedêutica Complementar – Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

^d Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

^e Universidade Estadual de Montes Claros, Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro – Vila Mauricéia, Montes Claros, MG, Brazil

^f Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Minas Gerais, Brazil

^g Instituto Biomanguihos – Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

^h Departamento de Microbiologia – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2010

Received in revised form 29 July 2010

Accepted 7 August 2010

Available online 21 August 2010

Keywords:

17DD vaccine

Yellow fever

Cytokines

Innate and adaptive immunity

ABSTRACT

The mechanisms of immune response following yellow fever (YF-17DD) vaccination are still poorly understood. In this study, we have performed a longitudinal investigation (days 0, 7, 15 and 30) to characterize the cytokine profile of innate and adaptive immunity following YF-17DD first-time vaccination. Data from non-stimulated cultures demonstrated a prominent participation of the innate immunity with increased frequency of TNF- α ⁺ neutrophils and IFN- γ ⁺ NK-cells at day 7 besides TNF- α ⁺ monocytes at day 7, day 15 and day 30. Increased frequency of IL-10⁺ monocytes was observed at day 15 and day 30, and decreased percentage of IL-4⁺ NK-cells were detected at day 7, day 15 and day 30. Time-dependent and oscillating cytokine pattern was observed in CD4⁺ T-cells, with low percentage of IL-12⁺, IL-4⁺ and IL-10⁺ cells at day 7 and increased frequency of TNF- α ⁺ cells at day 15 besides IFN- γ ⁺ and IL-5⁺ cells at day 15 and day 30. Later changes with increased percentage of IL-12⁺ and IL-5⁺ CD8⁺ T-cells were observed at day 30. Increased frequency of IL-10⁺ B-cells was observed at day 15, when seroconversion was detected in all vaccinees. The overall cytokine analysis of non-stimulated leukocytes showed a transient shift towards a pro-inflammatory profile at day 7, mainly due to changes in the innate immunity, which draws back toward a mixed/regulatory pattern at day 15 and day 30. The changes induced by the *in vitro* YF-17DD vaccine-stimulation were mainly observed at day 0 and day 7 (before seroconversion) with minor changes at day 15 and day 30 (after seroconversion). These data support the hypothesis that a complex network with mixed pro/anti-inflammatory cytokine profile is associated with the establishment of the protective immunity following YF-17DD primo-vaccination, free of adverse events.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Yellow fever (YF) is a severe viral disease of humans caused by YF virus, a mosquito-transmitted member of the Flaviviridae family with clinical spectrum ranging from subclinical infection to overwhelming pansystemic disease [1,2]. The disease is endemic

in sub-Saharan Africa and tropical regions of South America and also in several Caribbean islands. In the past 20 years, the global epidemic arboviral activity has dramatically increased with more than 200,000 cases and 30,000 deaths registered a year [3,4]. The disease can be prevented by a live attenuated vaccine, originally prepared from the 17D strain, and developed following successive passages of wild-type YF strain Asibi in mouse and chicken tissue. Two substrains are currently used worldwide, 17D-204 and 17DD, which are at passages 235–240 and 287–289, respectively, from wild-type Asibi virus [5,6].

A single immunization induces seroconversion in more than 95% of recipients with long-lasting neutralizing antibody levels besides YF-specific T-cell responses with minimal incident of severe side

* Corresponding author at: Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto – Belo Horizonte – Minas Gerais – 30 190 002, Brazil. Tel.: +55 31 3349 7764; fax: +55 31 3295 3115.
E-mail address: oamfilho@cpqrr.fiocruz.br (O.A. Martins-Filho).

effects [5,7–9]. Since 1937, this vaccine has protected more than 400 million humans from YF and it is considered as one of the most successful live attenuated vaccines available [10–12]. Despite this outstanding efficacy, the mechanisms underlying the robust immunity triggered by the 17D-204 and 17DD YF vaccines are still poorly understood.

Although, the humoral immune response induced by the YF vaccine is generally considered as the main mediator of protection against infection with wild-type YF virus, the cellular immunity, both innate and adaptive, has been pointed out as an important event playing pivotal role to generate an effective protection following YF vaccination with YF-17DD (FIOCRUZ), YF-VAX (Aventis Pasteur) and YF-VAX (Connaught Laboratories) [9,13–18].

Recently, a novel proposal has been raised by the scientific community, suggesting that the induction of complex immune response, including activation/modulation events as well as a mixed cytokine profile, is in fact triggered by the YF-17D vaccination, which seems to play a pivotal role in inducing a protective immunity and in avoiding adverse reactions in primo-vaccinees [13–17,19,20].

In the current report, we have performed a detailed investigation of intracytoplasmic cytokine pattern of peripheral blood innate and adaptive leukocytes aiming to characterize the kinetics and the major sources of cytokines following first-time vaccination with YF-17DD. Our findings confirmed the existence of mixed pattern of cytokines following YF vaccination, highlighting in the innate immunity compartment the relevance of neutrophils and monocytes as an early source of TNF- α and NK-cells supplying IFN- γ , both counterbalanced by enhanced levels of IL-10 $^{+}$ monocytes. In the adaptive immunity environment the early and transient downregulation of cytokine synthesis by CD4 $^{+}$ T-cells were prompt changed toward a mixed profile characterized by enhanced frequency of IFN- γ^{+} , TNF- α^{+} and IL-5 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T-cells with CD8 $^{+}$ T-cells pointed as a late source of IL-12 and IL-5. B-cells were identified as the source of IL-10 at day 15, when seroconversion was observed in all vaccinees. The overall cytokine signature showed that the transient pro-inflammatory profile observed at day 7, mainly due to the innate immunity cells, draws back toward a mixed or modulated pattern at day 15 and day 30 in most vaccinees.

2. Patients, material and methods

2.1. Study population

This longitudinal investigation consisted of four consecutive analysis of 10 healthy volunteers, aged 21–51 years with no history of previous YF vaccination or infection with the wild-type YF virus, confirmed by negative plaque reduction neutralization test (PRNT), carried out at Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais under supervision of Dra. Erna Geessien Kroon.

Each volunteer was vaccinated subcutaneously with a single 0.5 mL dose of YF-17DD vaccine (Batch# 007VFA 010Z) as recommended by the manufacturer (Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Brazil). Following vaccination, all volunteers were questioned about clinical signs and symptoms, and none adverse events were reported.

Peripheral blood samples (10 mL) were collected into VacutainerTM tubes containing sodium heparin (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) at four consecutive periods including: before vaccination (day 0) and seven (day 7), fifteen (day 15) and thirty (day 30) days after YF-17DD primo-vaccination.

All subjects signed an informed consent, approved by the Ethical Committee of the Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ – protocol # 03/2002), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2.2. In vitro short-term whole blood culture

The short-term whole blood cultures were performed as described by Peruhype-Magalhães et al. [21], modified as follows: 500 μ L aliquots of heparinized peripheral blood were dispensed into triplicates of 14 mL polypropylene tubes (Falcon[®], B.D. Pharmingen, San Diego, CA) and incubated for 6 h at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in the presence of 500 μ L of RPMI 1640 (GIBCO – Grand Island, NY) plus 50 μ L vaccine diluent (non-stimulated culture) or in the presence of 500 μ L of RPMI 1640 (GIBCO – Grand Island, NY) plus 50 μ L of live attenuated YF-17DD vaccine (lot# 02UVFB005Z – BioManguinhos – FIOCRUZ) at final concentration of 10⁶ viral particles/mL (YF-17DD stimulated culture). After priming, 10 μ g/mL of Brefeldin A-BFA (Sigma – Chemical Company – St Louis, MO) were added and the samples were re-incubated for an additional 4 h at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Following incubation, the cultures were treated with 2 mM ethylenediamine tetraacetic acid–EDTA, (Sigma – Chemical Company – St Louis, MO) and maintained at room temperature for 15 min. Following EDTA treatment, the triplicates were pooled together into one 14 mL polypropylene tubes and then washed once with 6 mL of FACS buffer (0.015 M phosphate buffered saline–PBS, supplemented with 0.5% bovine serum albumin–BSA and 0.1% sodium azide) by centrifugation at 600 \times g for 7 min at room temperature. After centrifugation, the supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended in 1 mL of FACS buffer. The cell suspension was immediately submitted to immunophenotyping and intracytoplasmic cytokine analysis by flow cytometry.

Positive control cultures were performed in order to evaluate the sample viability. For this purpose, 500 μ L aliquots of whole blood were incubated in the presence of 500 μ L of RPMI 1640 plus Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-PMA, ionomycin and BFA at final concentration of 25 ng/mL, 1 μ g/mL and 10 μ g/mL, respectively. Positive control cultures were incubated for 4 h at 37 °C in a 5% CO₂ humidified incubator. Positive control (PMA stimulated culture) characterized by high levels of IFN- γ^{+} and TNF- α^{+} cells were used in all immunophenotyping and intracytoplasmic cytokine analysis to confirm cell viability of all blood samples (data not shown).

2.3. Immunophenotyping and intracytoplasmic cytokines analysis by flow cytometry

The analysis of intracytoplasmic cytokines in peripheral blood leukocyte subsets was performed as described by Peruhype-Magalhães et al. [21]. Briefly, 200 μ L aliquots of EDTA-treated cultures were dispensed into five 12 \times 75 mm polystyrene tubes and individually stained with anti-human cell surface markers monoclonal antibodies (mAbs), including anti-CD4 (clone RPA-T4), CD8 (clones RPA-T8), CD14 (clone Tük4), CD16 (clone 3G8) and CD19 (clones 4G7 or SJ25-C1) labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) or TRI-COLOR (TC), purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) or Caltag (Burlingame, CA, USA). Following incubation for 30 min at room temperature in the dark, stained samples were gently treated while vortexing with 2 mL of FACS erythrocyte lysing solution (Becton Dickinson Biosciences) and re-incubating for an additional 10 min at room temperature in the dark. After erythrocyte lysis, the samples were centrifuged at 600 \times g for 7 min at room temperature, the supernatant discarded and the cell pellet resuspended and

incubated with 2 mL of FACS permeabilizing solution (FACS buffer supplemented with 0.5% of saponin) for 10 min at room temperature in the dark. Following incubation the samples were centrifuged at $600 \times g$ for 7 min at room temperature, the supernatant decanted gently and the cell pellet was washed with 3 mL of FACS buffer. After centrifugation, the cells were resuspended in 200 μ L of FACS buffer and distributed in 30 μ L aliquots over 96-well U-bottomed microplates. Cells were then stained with 20 μ L of phycoerythrin (PE)-labeled anti-cytokine mAbs, including anti-IFN- γ (clone B27), TNF- α (clone Mab11), IL-12 (clone C11.5.14), IL-10 (clone JES3-9D7), IL-4 (clone MP4-25D2) and IL-5 (clone TRFK5), all purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), previously diluted 1:50 in sterile FACS permeabilizing solution. After incubation for 30 min at room temperature in the dark, the cells were washed twice with 200 μ L of FACS permeabilizing solution and FACS buffer, respectively, fixed with 200 μ L of FACS fixing solution (10 g/L paraformaldehyde, 10.2 g/L sodium cacodylate and 6.63 g/L sodium chloride, pH 7.2) and stored at 4 °C in the dark prior flow cytometry acquisition within 24 h.

2.4. Flow cytometry acquisition and analysis

Flow cytometry acquisition and analysis were performed in a FACScalibur™ flow cytometer equipped with four colors detection system (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), using the CELLQUEST software (Franklin Lakes, NJ, USA). After acquiring 30,000 events/tube, distinct gating strategies were used to analyze the different cytokine-expressing leukocytes subsets, including innate (neutrophils, monocytes and NK cells) and adaptive immunity cells (CD4⁺, CD8⁺ T-cell subsets and B-cell).

Selective analysis of neutrophils was performed by establishing a specific scatter gate using the dot plot distribution of anti-CD16-FITC and laser side scatter (SSC) to discriminate the neutrophils as SSC^{high}CD16^{high}. Analysis of monocytes was performed using the dot plot distribution of anti-CD14-TC and SSC to discriminate the monocytes as SSC^{int}CD14^{high} cells. The selection of NK cells, T-cell subsets and B-cells was performed by initially gating the lymphocytes on forward scatter (FSC) versus SSC dot plot distribution, followed by analysis on anti-CD16-FITC, anti-CD19-FITC, anti-CD8-FITC or anti-CD4-TC. Following the selection of leukocytes subset, the frequency of cytokine⁺ cells was determined using quadrant statistics over FL-1/anti-cell surface marker-FITC or FL-3/anti-cell surface marker-TC versus FL-2/anti-cytokine-PE dot plot distribution. The results were expressed as percentages of cytokine⁺ cells for different gated leukocytes subpopulations analyzed.

2.5. Analysis of overall cytokine profile

The analysis of overall cytokine profile was assessed to characterize the general cytokine pattern of each vaccinee as previously suggested by Vitelli-Avelar et al. [22], modified as follows: the percentages of cytokine⁺ cells were compiled using a five step platform, as follows: (i) establishment of the global median of cytokine⁺ cell for each leukocyte subset, taking all values from day 0, day 7, day 15 and day 30 as illustrated for monocytes in Fig. 5 – top graphs; (ii) classification of each leukocyte subsets as low (○ for all cytokines) and high cytokine-producers (● for inflammatory cytokines: IFN- γ , TNF- α and IL-12; ⊙ for regulatory cytokines: IL-10, IL-4 and IL-5), using the global median values as the cut-off edge, as illustrated for monocytes in Fig. 5 – top graphs; (iii) creation of gray-scale diagrams for each leukocyte subset, representing for each volunteer (V1–V10) the low cytokine-producers (□), high cytokine-producers (■ for predominant inflammatory profile; ▣

for predominant regulatory profile) and mixed cytokine-producers (▢ for simultaneous high inflammatory and regulatory profile) (Fig. 5); (iv) classification of the overall leukocyte cytokine profile predominant for each volunteer (Fig. 5 – column chart); and (v) definition of the final frequency of each cytokine pattern at day 0, day 7, day 15 and day 30 (Fig. 5 – pie chart).

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by paired Wilcoxon's *T* test for comparisons between day 0, day 7, day 15 and day 30, using the GraphPad Prism 4.03 software package (USA). Significant differences are identified in the figures by the letters 'a', 'b', 'c' and 'd' for comparisons between day 0, day 7, day 15 and day 30, respectively. Significant differences between non-stimulated and YF-17DD stimulated cultures are highlighted by asterisks. In all cases, significance was considered at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Prominent participation of innate immunity is observed in healthy adults after YF-17DD primo-vaccination

Aiming to characterize the pro- and anti-inflammatory cytokine profiles of innate immunity cells following YF-17DD vaccination, we have analyzed the *ex vivo* intracytoplasmic cytokine pattern of peripheral blood leukocytes after short-term culture of whole blood samples, particularly in the absence of exogenous stimuli, here referred as non-stimulated culture (Fig. 1). Our data showed a prominent involvement of innate immunity cells, as demonstrated by increased frequency of TNF- α ⁺ neutrophils at day 7 as compared to day 0. Moreover, analysis of monocytes demonstrated increased percentage of TNF- α ⁺ cell at day 7, day 15 and day 30 as compared to day 0 and increase of IL-10⁺ cells at day 15 as compared to day 0 and day 7, and at day 30 as compared to day 0. Furthermore, our data showed increased frequency of IFN- γ ⁺ NK-cells at day 7 as compared to day 0, and decreased percentage of IL-4⁺ NK-cells at day 7, day 15 and day 30 as compared to day 0.

The analysis of the cytokine patterns of innate immunity leukocytes in the YF-17DD stimulated culture also demonstrated significant differences on the cytokine profile of neutrophils, monocytes and NK-cells (Fig. 1). Significant decrease of IL-10⁺ neutrophils was observed at day 30 as compared to day 7. Moreover, significant increase of IL-10⁺ monocytes was found at day 30 as compared to day 7. Analysis of NK-cells showed decreased levels of IL-4⁺ cells at day 7 as compared to day 0.

Comparative analysis of non-stimulated and YF-17DD stimulated cultures pointed out a prominent and selective increase of TNF- α ⁺ monocytes at all times evaluated and an increase of IFN- γ ⁺ NK-cell at day 0 (Fig. 1 – asterisks).

Taken together, these findings emphasize that the YF-17DD vaccination comprises a complex cytokine network at the innate immunity compartment, involving both pro- and anti-inflammatory cytokines produced by neutrophils, monocytes and NK cells. The major changes in the innate immunity compartment are summarized in Fig. 4.

3.2. Time-dependent and oscillating changes in the cytokine profile of CD4⁺ T-cells with late involvement of CD8⁺ T-cells is the hallmark of adaptive cellular immune response following YF-17DD primo-vaccination

In order to evaluate the dynamic of events in the cytokines network concerning the adaptive cellular immune response, we have characterized the cytokine profile of circulating CD4⁺ and

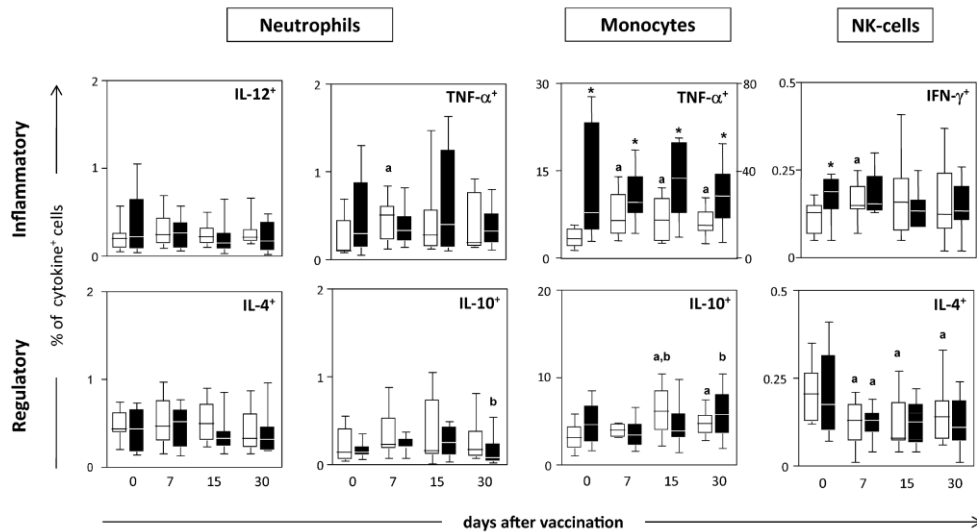


Fig. 1. Intracellular cytokine profile of innate immunity leukocytes in peripheral blood of healthy adults at day 0, day 7, day 15 and day 30 following YF-17DD primo-vaccination. Phenotypic and intracytoplasmic cytokine studies were performed after *in vitro* short-term incubation in the absence (non-stimulated culture □ – left axis for TNF- α^+ monocytes) or in the presence of specific antigen stimuli (YF-17DD stimulated culture ■ – right axis for TNF- α^+ monocytes), using anti-CD16-FITC mAbs to identify neutrophils (SSC^{high}CD16^{high}) and NK-cells (CD16⁺ lymphocytes) or anti-CD14-FITC for monocytes (SSC^{int}CD14^{high}) together with anti-cytokines-PE mAbs to determine inflammatory (top panels) and regulatory (bottom panels) cytokines⁺ cells. The results are expressed in box plot format, with boxes stretching from the 25th percentile to the 75th percentile and the line across the box representing the median values. Significant differences at $p < 0.05$ are identified by the letters "a" and "b" for comparison with day 0 and day 7, respectively. Differences between non-stimulated and YF-17DD stimulated cultures at $p < 0.05$ are identified by *.

CD8⁺ T-cells after short-term incubation *in vitro* either in the absence or presence of YF-17DD stimuli (Fig. 2). Data analysis of non-stimulated culture demonstrated a time-related change in the cytokine profile of CD4⁺ T-cells, with decreased frequency of IL-12⁺ and IL-4⁺ cells at day 7 as compared to day 0 and day 30 and decreased percentage of IL-10⁺ cells as compared to day 0 and day 15. On the other hand, increased frequency of TNF- α^+ CD4⁺ T-cells was observed at day 15 as compared to day 7. Moreover, increased frequency of IFN- γ^+ and IL-5⁺ CD4⁺ T-cells was observed at day 15 and day 30 as compared to day 0 and day 7.

Differently, the CD8⁺ T-cells exhibited later changes in the cytokine pattern, as demonstrated by enhanced frequency of IL-12⁺ and IL-5⁺ CD8⁺ T-cells at day 30 as compared to day 0, day 7, and day 15, respectively.

The analyses of YF-17DD stimulated culture demonstrated similar time-dependent and oscillating changes in the cytokine profile of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Data analysis pointed towards decreased frequency of IL-12⁺, IL-4⁺ and IL-10⁺ CD4⁺ T-cells at day 7. On the other hand, increased percentage of IL-5⁺ CD4⁺ T-cells was observed at day 7, day 15 and day 30 and IFN- γ^+ CD4⁺ T-cells at day 30. Similarly, increased frequency of IL-12⁺ CD8⁺ T-cells was observed late at day 30 as compared to day 7.

The comparison between non-stimulated and YF-17DD stimulated culture also demonstrated a time-dependent impact on CD4⁺ T-cells with decreased frequency of IL-10⁺ cells observed at day 0 and increased percentage of IL-4⁺, IL-10⁺ and IFN- γ^+ cells observed at day 7, day 15 and day 30, respectively (Fig. 2 – asterisks).

Together these data also highlights that the YF-17DD vaccination comprises a complex and time-dependent cytokine network at the adaptive cellular immunity compartment involving both pro- and anti-inflammatory cytokines produced by CD4⁺ and CD8⁺ T-

cells. The major changes in the adaptive immunity compartment are summarized in Fig. 4.

3.3. The increased frequency of IL-10⁺ B-cell is observed at day 15 when seroconversion was already observed in all YF-17DD adult primo-vaccinees

Aiming to characterize the phenotypic features of the humoral immune response, we have analyzed the *ex vivo* levels of seric neutralizing antibodies and also characterized the *in vitro* cytokine profile of circulating B-cells after short-term incubation in the absence or in the presence of YF-17DD stimuli (Fig. 3). Data analysis demonstrated that despite three out of ten vaccinees seroconverted at day 7, at day 15 all vaccinees already presented seroconversion pattern as demonstrated by PRNT titer above the cut-off line (200 mUI/mL). Analysis of intracytoplasmic profile in the non-stimulated cultures demonstrated increased frequency of IL-10⁺ B-cells at day 15 concomitant with the seroconversion of all vaccinees. Despite no changes observed in the cytokine profile of B-cells upon YF-17DD stimuli, the comparative analysis of non-stimulated and YF-17DD stimulated cultures revealed an increase in the percentage of TNF- α^+ B-cells at day 30 (Fig. 3 – asterisk). The change in the B-cell compartment is summarized in Fig. 4.

3.4. The analysis of the overall cytokine profile of circulating leukocytes further emphasize the complex cytokine network triggered by the YF-17DD adult primo-vaccination

Aiming to further characterize the cytokine profile of peripheral blood leukocytes following the YF-17DD primo-vaccination, we have used a novel strategy to access the overall cytokine profile

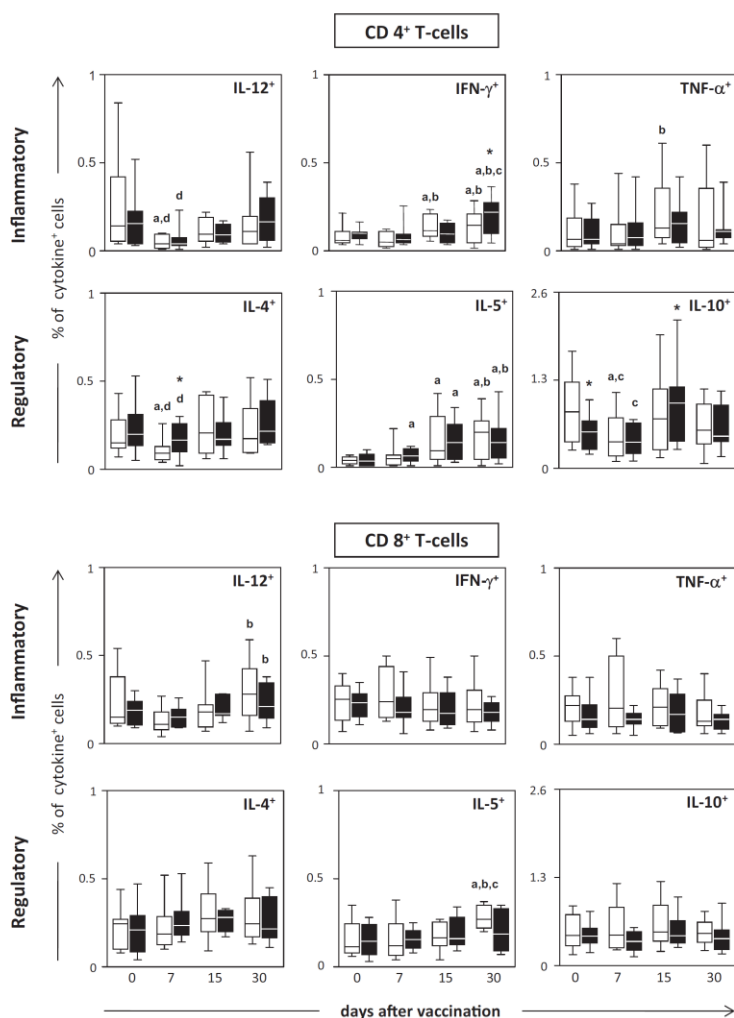


Fig. 2. Intracellular cytokine profile of adaptive cellular immunity lymphocytes in peripheral blood of healthy adults at day 0, day 7, day 15 and day 30 following YF-17DD primo-vaccination. Phenotypic and intracytoplasmic cytokine studies were performed after *in vitro* short-term incubation in the absence (non-stimulated culture □) or in the presence of specific antigen stimuli (YF-17DD stimulated culture ■) using anti-CD4-FITC mAbs to identify T-helper cells (CD4⁺ lymphocytes) and anti-CD8-TC mAbs to label cytotoxic T-cells (CD8⁺ lymphocytes) together with anti-cytokines-PE mAbs to determine inflammatory (top panels) and regulatory (bottom panels) cytokines⁺ lymphocytes. The results are expressed in box plot format, with boxes stretching from the 25th percentile to the 75th percentile and the line across the box representing the median values. Significant differences at $p < 0.05$ are identified by letters "a", "b", "c" and "d" for comparison with day 0, day 7, day 15 and day 30, respectively. Differences between non-stimulated and YF-17DD stimulated cultures at $p < 0.05$ are identified by *.

proposed by Vitelli-Avelar et al. [22] to determine the kinetic frequency of cytokine producers (□ for low, ■ for high-inflammatory, ▨ for high-regulatory and ▩ for mixed cytokines producers) at day 0, day 7, day 15 and day 30 following YF-17DD primo-vaccination. (Fig. 5 – gray-scale diagrams, columns and pie charts).

The overall cytokine analysis of non-stimulated leukocytes showed a transient shift from a predominant mixed pattern at day 0 (observed in 60% of the subjects) towards a pro-inflammatory profile at day 7 (observed in 60% of primo-vaccinees), mainly due to changes in the innate immunity compartment. This inflammatory profile draws back toward a mixed/regulatory pattern at day 15 and day 30 with most vaccinees (80%) tending to restore

the mixed or regulatory overall cytokine profile observed at day 0.

Upon YF-17DD stimuli, the major changes were observed at day 0 and day 7 (before seroconversion) with minor changes at day 15 and day 30 (after seroconversion). At day 0 the antigen stimulation shifted the cytokine profile toward an inflammatory pattern in 2 out of 10 volunteers. On the other hand, at day 7 the antigen stimulation was able to completely abolish the inflammatory profile previously observed in the non-stimulated culture. At day 15, when seroconversion is already observed in all vaccinees, no evident change in the overall cytokine profile was observed between non-stimulated and YF-17DD stimulated cultures, highlighting the

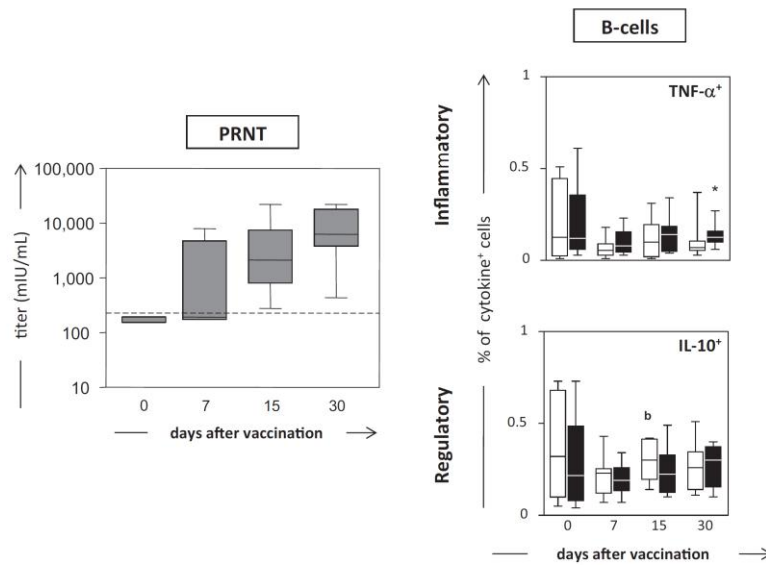


Fig. 3. Phenotypic features of adaptive humoral immunity in peripheral blood of healthy adults at day 0, day 7, day 15 and day 30 following YF-17DD primo-vaccination. YF-17DD specific seric antibody levels (left panel) were quantified by plaque reducing neutralizing test (PRNT) and the results expressed as mIU/mL. The dashed line represents the cut-off line used to segregate negative and positive results (200 mIU/mL). Phenotypic and intracytoplasmic cytokine data (right panels) were obtained after *in vitro* short-term incubation in the absence (non-stimulated culture □) or in the presence of specific antigen stimuli (YF-17DD stimulated culture ■), using anti-CD19-FITC mAbs to identify B-cells (CD19⁺ lymphocytes) together with anti-cytokines-PE mAbs to determine inflammatory (top panels) and regulatory (bottom panels) cytokines⁺ lymphocytes. All results are expressed in box plot format, with boxes stretching from the 25th percentile to the 75th percentile and the line across the box representing the median values. Significant difference at *p* < 0.05 is identified by the letter "b" for comparison with day 7. Difference between non-stimulated and YF-17DD stimulated cultures at *p* < 0.05 is identified by *.

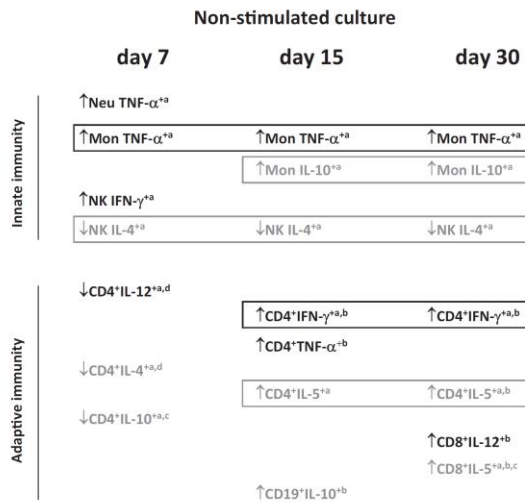


Fig. 4. Major changes in the cytokine profile of innate and adaptive immunity leukocytes in peripheral blood samples from healthy vaccinees at day 7, day 15 and day 30 following YF-17DD primo-vaccination. Increased (↑) and decreased (↓) levels of inflammatory (in black) and regulatory (in gray) cytokines highlight the complex cytokine network triggered by the YF-17DD primo-vaccination. Letters "a", "b", "c" and "d" represent significant differences at *p* < 0.05 for comparisons with day 0, day 7, day 15 and day 30, respectively. Rectangles emphasize persistent changes observed during the kinetic follow-up study.

ability of PRNT antibodies to minimize the impact of YF antigen on the immune system. At day 30, the YF-17DD antigenic stimulation was accompanied by similar frequency of vaccinees with mixed cytokine profiles and induced a slight shift towards an inflammatory pattern (20–40%) reflecting the increased levels of TNF-α⁺ monocytes and B-cells and IFN-γ⁺ CD4⁺ T-cells observed at day 30 following *in vitro* stimulation of YF-17DD antigens (Figs. 1–3).

4. Discussion

The major goal of this study was to identify the major sources of pro- and anti-inflammatory cytokines, aiming to add new elements to the complex cytokine network triggered by the YF-17DD primo-vaccination. These findings may help not only for the understanding of the immunological mechanism underlying the establishment of protective immunity but also supply new insights to support the investigation of severe adverse diseases following YF-17D vaccination. Moreover, considering the outstanding performance of the YF vaccine, the detailed identification of each cell source of cytokine may also help the rational development of new vaccines.

For several decades, it has been postulated that a potent pro-inflammatory immune response, mediated by Type-1-cytokines, such as IFN-γ and TNF-α, was crucial to the development of anti-YF protective immunity [23–26]. The pioneer investigation of Wheelock and Sibley have demonstrated that YF 17D-204 vaccinees displayed increased plasmatic levels of IFN-γ (measured by a bioassay), peaked at 24 h after viremia, which declined rapidly thereafter [23]. In addition, elevated levels of the IFN-dependent enzyme 2',5'-oligoadenylate synthase have been demonstrated in T and B-cells

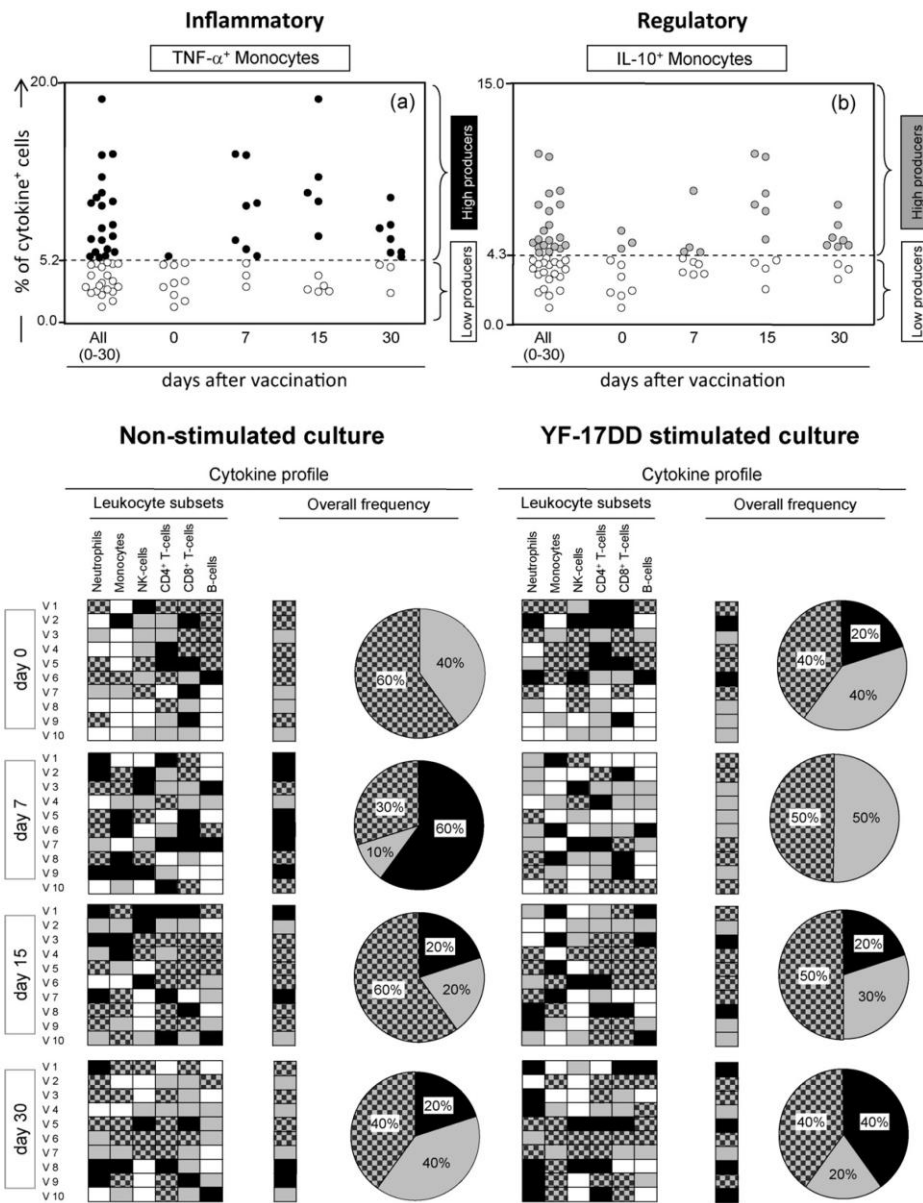


Fig. 5. Overall cytokine profile of peripheral blood leukocytes from healthy adults at day 0, day 7, day 15 and day 30 following YF-17DD primo-vaccination. Cytokine studies were performed after *in vitro* short-term incubation in the absence (non-stimulated culture) or in the presence of specific antigen stimuli (YF-17DD stimulated culture), as previously reported by Vitelli-Avelar et al. [22], consisting of a five step platform: (i) establishment of the global median of cytokine+ cells; (ii) classification low (\circ) for all cytokines and high cytokine-producers (\bullet – inflammatory and \odot – regulatory), using the global median values as the cut-off edge (dotted lines), as illustrated for monocytes in the top panels; (iii) creation of gray-scale diagrams (bottom panels) for each leukocyte subset, representing for each volunteer (V1–V10) the low cytokine-producers (\square), high cytokine-producers (\blacksquare) for predominant inflammatory profile; (\square) for predominant regulatory profile) and mixed cytokine-producers (\boxtimes) for simultaneous high inflammatory and regulatory profile); (iv) classification of the overall leukocyte cytokine profile predominant for each volunteer (column chart) and (v) definition of the final frequency of each cytokine pattern at day 0, day 7, day 15 and day 30 (pie chart).

early after the immunization with the YF 17D-204 vaccine [24]. Reinhardt et al. have observed an increased level of neopterin, a protein induced by INF- γ , following primary YF-17D-204 immunization [25]. Moreover, increased plasmatic levels of TNF- α have also been reported at day 2 and day 7 after primo-vaccination with YF-17D-204 [26].

Martins et al. have hypothesized that a controlled microenvironment including mechanism of activation/modulation of both innate and adaptive immunity seems to be the key to the development of protective immunity triggered by the YF-17DD vaccine [14,15]. Moreover, Gauche et al. have suggested that a mixed Th1/Th2 cytokine response that appears early and is persistent after primo-vaccination, characterized by increased levels of IL-2, IFN- γ and TNF- α besides IL-4 and IL-10 profiles. These findings are observed following *in vitro* stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from YF-17D-204 vaccinees [16]. Santos et al. have recently reported that a mixed cytokine profile is observed in YF-17-DD primo-vaccinees [17]. Despite these new insights toward the novel concept of mixed cytokine signature following the YF vaccination, the cell sources of specific cytokines triggered after 17DD vaccination are still unknown.

The current study have added new elements to the complex cytokine network triggered by the YF-17DD vaccination, demonstrating that the transient inflammatory profile observed at day 7 was mainly due to increased frequency of TNF- α^+ neutrophils and monocytes and IFN- γ^+ NK-cells triggered after vaccination suggesting an effective role of innate immune cells to the establishment of this microenvironment. TNF- α is the major component of the immune system involved in the control of virus infection through direct antiviral activity, usually in association with interferons and the induction of apoptosis [27]. Hacker et al. have previously reported an increase in the seric levels of TNF- α early after the YF-17D-204 vaccination [26]. Our findings add new elements to this observation, suggesting that monocyte and neutrophils might represent the major sources of TNF- α at day 7 after YF-17D vaccination. The increased frequency of TNF- α^+ cells neutrophils and monocytes as well as the increased percentage of IFN- γ^+ NK-cells may reflect the establishment of anti-viral immune response triggered by the viremia typically reported from days 3 to 7 post-vaccination following 17D vaccination [25,28]. Corroborating this data, Martins et al. have demonstrated that increased frequency of macrophage-like (CD14 $^+$ CD16 $^+$), activated monocytes (CD14 $^+$ CD16 $^{\text{high}}$), pro-inflammatory monocytes (CD14 $^+$ CD16 $^+$ HLA-DR $^{++}$) as well as increased frequency of activated neutrophils (CD28 $^+$, CD16 $^{\text{high}}$ and CXCR4 $^+$) can be observed at day 7 after YF-17DD vaccination [15]. Moreover, Neves et al. have described an increased expression of activation markers in circulating NK-cells [18].

Our data demonstrated that the increased frequency of TNF- α^+ monocytes can be observed throughout the post-vaccination period up to day 30. We believe that this phenomenon may be important to control the occurrence of the severe adverse disease after YF-17D vaccination (YEL-AVD), since we have previously reported that YEL-AVD is associated with impaired TNF- α synthesis by monocytes at day 15 after vaccination [20].

It was interesting to notice that the early and persistent increase in the percentage of TNF- α^+ monocytes observed throughout the post-vaccination period was counterbalanced after day 15 by an increased frequency of monocytes IL-10 $^+$ cells, electing the monocytes as an important cell-type involved in modulatory event triggered by the YF-17DD vaccination. These data are consistent with those previously reported by Martins et al., demonstrating a significant increase of IL-10R $^+$ on monocytes at day 15 after YF-17DD vaccination [15]. It has been demonstrated that endogenous IL-10 produced by human monocytes/macrophages is able to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines by mono-

cytes/macrophages, such as IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α , and also inhibit the synthesis of IL-1, IL-8 and TNF- α by neutrophils. This may represent an important mechanism controlling the transient pro-inflammatory response observed at day 7 after YF vaccination. Moreover, it has been demonstrated that IL-10 also regulates the growth and/or differentiation of NK-cells, T-cell subsets and B-cells [29,30].

In the context of adaptive immune system, our results show an early and transient downregulation of cytokine synthesis by CD4 $^+$ T-cells (IL-12, IL-4 and IL-10). We believe that the impairment of cytokine synthesis by CD4 $^+$ T-cells observed at day 7 after YF-17DD vaccination may be due in part to the direct impact of peak of viremia temporally observed at this time after primo-vaccination. This may also represent a modulatory mechanism to counter balance the intense activation of the innate immunity observed not only in neutrophils, monocytes and natural killer cells but probably also in DCs, representing an important cross-talk between innate and adaptive immunity that re-enforces the hypothesis of simultaneous activation/modulation following YF-17DD vaccination.

In agreement with the hypothesis that a mixed cytokine signature is triggered by the YF-17D vaccine [13–17], our data demonstrated a simultaneous increase in pro- and anti-inflammatory cytokines in T-cell subsets at day 15 and day 30. Specifically, increased levels of IFN- γ^+ , TNF- α^+ and IL-5 $^+$ CD4 $^+$ T-cells observed at day 15 followed by persistent increase in the percentage of IFN- γ^+ and IL-5 $^+$ CD4 $^+$ T-cells concomitant with late increase IL-12 $^+$ and IL-5 $^+$ CD8 $^+$ T-cells at day 30. The late recruitment of CD8 $^+$ T-cells following YF-17DD vaccination has been already reported by Martins et al., as demonstrated by increased frequency of CD8 $^+$ HLA-DR $^+$ at day 30 after 17DD vaccination [14].

Santos et al. have also presented data that support the existence of mixed cytokine signature at day 15 after vaccination, as demonstrated by increased levels of IFN- γ and IL-4 following *in vitro* stimulation of PBMC from YF-17DD vaccinees [17]. In our study, we did not detect any major source of IL-4 $^+$ cells throughout the post-vaccination periods analyzed. In fact, we have observed a decrease in the frequency of IL-4 $^+$ cells, mainly in NK-cells (day 7, day 15 and day 30) and CD4 $^+$ T-cells (day 7). We believe that methodological particularities, such as the use of long-term incubation of isolated PBMCs in the absence of autologous plasma [17] instead the use of short-term incubation of whole blood samples may be related to these apparently distinct data. In our model, the presence of autologous plasma, rich on YF-neutralizing antibodies probably had a strong impact in the microenvironment that does not turn out in expressive IL-4 synthesis. Further analyses are currently under evaluation to investigate this hypothesis.

The increased frequency of IL-5 $^+$ T-cells at day 15 and day 30 may represent an important mechanism linked to the B-cell activation process. Some studies had demonstrated levels of interleukin IL-5 in culture supernatant following 17D-YF vaccination [16,31]. In mouse, IL-5 has been showed to be essential for the differentiation of antibody-secreting B-cells [32,33], whereas in human this still remain controversial [34–36]. Our results demonstrated a significant increased frequency of IL-10 $^+$ B-cells at day 15 concomitant with the seroconversion of all vaccinees. Interestingly, Martins et al. have already reported that at day 15 post-vaccination a significant increase in the expression of IL-10R can be observed in parallel with enhanced frequency of activated B-cells [14]. In humans, IL-10 potentiates DNA replication on B-cells and is also a very potent factor to induce B-cell differentiation and secretion of immunoglobulins [37–40]. The IL-10/IL-10R interaction has been pointed out as an important event to prevent apoptosis and enhances the proliferation and differentiation of B-cells towards plasma cells [41,42].

In attempt to characterize the overall cytokine profile of peripheral blood leukocytes following the YF-17DD primo-vaccination, we have used a novel strategy to access the overall cytokine profile

proposed by Vitelli-Avelar et al. [22]. Our results demonstrated that the mixed cytokine pattern of whole blood cells before YF-17DD vaccination (day 0) was transiently shifted toward an inflammatory profile at day 7, mainly due to changes in the innate immunity cells, with the most relevant finding being the enhanced frequency of TNF- α ⁺ monocytes. This transient inflammatory cytokine pattern shifted toward a mixed/regulatory profile in 80% of the vaccinees remaining with this feature at day 30 in most vaccinees. This mixed/regulatory pattern could be in part supported by the increase of TNF- α ⁺/IL-10⁺ monocytes as well as IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺/IL-5⁺ CD4⁺ T-cells, IL-12⁺/IL-5⁺ CD8⁺ T-cells and IL-10⁺ B-cells.

Additional analysis revealed that the 17DD stimulation *in vitro* was able to induce even before vaccination (day 0) an inflammatory profile in 20% of the volunteers, probably due to the direct action of the viral antigen on the innate immunity cells, since these subjects were not previously primed by YF antigens. Moreover, at day 7 the overall inflammatory profile observed in the non-stimulated culture was overturned toward a mixed/regulatory pattern probably due to an over stimulation of the innate immunity cells by the antigenic booster *in vitro*. The massive antigenic stimulation, represented by the *in vivo* viremia plus the exogenous antigen stimuli *in vitro* led to changes in the cytokine profile of leukocyte subsets of both innate and adaptive compartments with a general impact in the overall frequency of cytokine profile. Interestingly, at day 15 and day 30, when all primo-vaccinees already presented YF neutralizing antibodies, the *in vitro* 17DD antigen stimulation induced minor changes in the overall cytokine profile.

In conclusion, our findings confirmed previous reports, suggesting that a parallel activation/modulation microenvironment with a mixed cytokine signature is the key to the establishment of protective immunity mechanisms triggered by the YF-17D vaccine. The novel contribution of this work was the possibility to identify the major sources of pro- and anti-inflammatory cytokines that contribute to this complex microenvironment, highlighting the role of the innate immunity (TNF- α ⁺ neutrophils, TNF- α ⁺ monocytes and IFN- γ ⁺ NK-cells, counterbalanced by IL-10⁺ monocytes) as well as the adaptive immunity (IFN- γ ⁺ and TNF- α ⁺ CD4⁺ T-cells and IL-12⁺ CD8⁺ T-cells modulated by IL-5⁺ CD4⁺ T-cells, IL-5⁺ CD8⁺ T-cells and IL-10⁺ B-cells).

Acknowledgments

This work was supported by Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ-MG and Instituto Bio-manguinhos – FIOCRUZ-RJ by the grant # carta compromisso 05/05 05/08, CNPq (Grant #422782/09) and FAPEMIG (APQ 01183-08). The authors thank the program for technological development in tools for health – PDTIS – FIOCRUZ for the use of its facilities. EGK, ATC and OAMF thank CNPq for fellowships (PQ). ACCA acknowledge the FAPEMIG for the fellowship (PDJ 00265/09).

References

- Monath TP, Centron MS, Teuwen DE. Yellow fever. In: Plotkin AS, Orenstein WA, editors. Vaccines. 5th ed. Philadelphia (WB): Saunders; 2008. p. 959–1055.
- Vasconcelos PFC. Febre Amarela. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2003;36(2):275–93.
- Gubler DJ. The global resurgence of arboviral diseases. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996;90(5):449–51.
- Tomori O. Yellow fever: the recurring plague. Crit Rev Clin Lab Sci 2004;41(4):391–427.
- Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. J Exp Med 1937;65(SV):787–800.
- Silveira-Lemos D, Martins MA, Silva ML, Homma A, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO. Insights on yellow fever immune response following natural infection and vaccination. Curr Tr Immunol 2008;9:1–14.
- Groot H, Riberiro RB. Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to fever 17 years after vaccination with 17D vaccine. Bull World Health Organ 1962;27(SV):699–707.
- Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30–35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. Bull World Health Organ 1981;59(6):895–900.
- Co MD, Terajima M, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL. Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. Virology 2002;293(1):151–63.
- World Health Organization. Yellow fever vaccine. WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 2003; 78:349–59.
- Monath TP. Yellow fever vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. 4th ed. Philadelphia (PA): W.B. Saunders; 2004. p. 1095–176.
- Pugachev KV, Guirakhoo F, Monath TP. New developments in flavivirus vaccines with special attention to yellow fever. Curr Opin Infect Dis 2005;18(5):387–94.
- Querec D, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. J Exp Med 2006;203(2):413–24.
- Martins MA, Silva ML, Marciano AP, Peruhype-Magalhães V, Eloi-Santos SM, Ribeiro GL, 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? Clin Exp Immunol 2007;148(1):90–100.
- Martins MA, Silva ML, Eloi-Santos SM, Ribeiro JG, Peruhype-Magalhães V, Marciano AP, et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. Vaccine 2008;26(9):1173–84.
- Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. J Exp Med 2008;205(13):3119–31.
- Santos AP, Matos DC, Bertho AL, Mendonça SC, Marcovistz R. Detection of Th1/Th2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay. Cytokine 2008;42(2):152–5.
- Neves PC, Matos DC, Marcovistz R, Galler R. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. Vaccine 2009;27(41):5543–9.
- Bae HG, Domingo C, Tenorio A, de Ory F, Muñoz J, Weber P, et al. Immune response during adverse events after 17D-derived yellow fever vaccination in Europe. J Infect Dis 2008;197(11):1577–84.
- Silva ML, Espírito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Peruhype-Magalhães V, Caminha RC, et al. Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination. Clin Vaccine Immunol 2010;17(1):118–26.
- Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva L de A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α (⁺) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. Clin Exp Immunol 2006;146(1):124–32.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Faria AM, et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. Scand J Immunol 2008;68(5):516–25.
- Wheelock EF, Sibley WA. Circulating virus, interferon and antibody after vaccination with the 17-D strain of yellow-fever virus. N Engl J Med 1965;273(SV):194–8.
- Bonnevie-Nielsen V, Heron I, Monath TP, Calisher CH. Lymphocytic 2',5'-oligoadenylate synthetase activity increases prior to the appearance of neutralizing antibodies and immunoglobulin M and immunoglobulin G antibodies after primary and secondary immunization with yellow fever vaccine. Clin Diagn Lab Immunol 1995;2(3):302–6.
- Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, Läge-Stehr J. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. J Med Virol 1998;56(2):159–67.
- Hacker UT, Jelinek T, Erhardt S, Eigler A, Hartmann G, Nothdurft HD, et al. *In vivo* synthesis of tumor necrosis factor- α in healthy humans after live yellow fever vaccination. J Infect Dis 1998;177(3):774–8.
- Herbein G, O'Brien WA. Tumor necrosis factor (TNF)- α and TNF receptors in viral pathogenesis. Proc Soc Exp Biol Med 2000;223(3):241–57.
- Barrett AD. Yellow fever vaccines. Biologicals 1997;25(1):17–25.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 1991;174(5):1209–20.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard MH, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol 1991;147(11):3815–22.
- Ahmad SM, Haskell MJ, Raqib R, Stephensen CB. Men with low vitamin A stores respond adequately to primary yellow fever and secondary tetanus toxoid vaccination. J Nutr 2008;138:2276–83.
- Coffman RL, Seymour BW, Lebnan DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. Immunol Rev 1988;102:5–28.
- Rasmussen RK, Takatsu K, Harada N, Takahashi T, Bottomly K. T cell-dependent hapten-specific and polyclonal B-cell responses require release of interleukin 5. J Immunol 1988;140:705–12.
- Kishimoto T, Hirano T. Molecular regulation of B lymphocyte response. Annu Rev Immunol 1988;6:485–512.

- [35] Mori A, Kaminuma O, Suko M, Mikami T, Nishizaki Y, Ohmura T, et al. Cellular and molecular mechanisms of IL-5 synthesis in atopic diseases: a study with allergen-specific human helper T cells. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100(6 Pt 2):S56–64.
- [36] Munno I, Centonze V, Marinaro M, Bassi A, Lacedra G, Causarano V, et al. Cytokines and migraine: increase of IL-5 and IL-4 plasma levels. *Headache* 1998;38(6):465–7.
- [37] Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Hsu D-H, Kastelein R, et al. IL-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1890–3.
- [38] Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med* 1992;175:671–82.
- [39] Rousset F, Peyrol S, Garcia E, Vezzio N, Andujar M, Grimaud JA, et al. Long-term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4. *Int Immunol* 1995;7:1243–53.
- [40] Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest* 1994;93:424–8.
- [41] Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765.
- [42] Wehinger J, Gouilleux F, Groner B, Finke J, Mertelmann R, Weber-Nordt RM. IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett* 1996;394(3):365–70.

4.2 Artigo 2

O artigo científico apresentado a seguir corresponde ao objetivo específico: Avaliar as alterações no padrão fenotípico de leucócitos circulantes e no perfil de quimiocinas/citocinas plasmáticas em casos de eventos adversos graves pós-vacinação antiamarílica.

Título: Clinical and Immunological Insights on Severe, Adverse Neurotropic and Viscerotropic Disease following 17D Yellow Fever Vaccination.

Autores: Silva ML, Espirito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Peruhype-Magalhaes V, Caminha RC, de Andrade Maranhao-Filho P, Auxiliadora-Martins M, de Menezes Martins R, Galler R, da Silva FM, Marcovitz R, Homma A, Teuwen DE, Eloi-Santos SM, Andrade MC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA.

Revista: Clinical and Vaccine immunology. 2009;17:118-6.

DOI: 10.1128/CVI.00369-09.

Clinical and Immunological Insights on Severe, Adverse Neurotropic and Viscerotropic Disease following 17D Yellow Fever Vaccination[∇]

Maria Luiza Silva,^{1,†} Luçandra Ramos Espírito-Santo,^{1,2,†} Marina Angela Martins,¹ Denise Silveira-Lemos,^{1,3} Vanessa Peruhype-Magalhães,⁴ Ricardo Carvalho Caminha,⁵ Péricles de Andrade Maranhão-Filho,⁵ Maria Auxiliadora-Martins,⁶ Reinaldo de Menezes Martins,⁷ Ricardo Galler,⁷ Marcos da Silva Freire,⁷ Rugimar Marcovistz,⁷ Akira Homma,⁷ Dirk E. Teuwen,^{8,10} Silvana Maria Elói-Santos,^{1,9} Mariléia Chaves Andrade,^{1,2} Andréa Teixeira-Carvalho,^{1,*} and Olindo Assis Martins-Filho^{1,10}

Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ/Minas, Avenida Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, MG CEP 30190-002, Brazil¹; Universidade Estadual de Montes Claros, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Vila Mauricéia, Montes Claros, MG CEP 39401-089, Brazil²; Núcleo de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, MG CEP 35400-000, Brazil³; Laboratório de Pesquisa Clínicas, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ/Minas, Avenida Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, MG CEP 30190-002, Brazil⁴; Hospital Universitário, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Trompowski s/n, 9º Andar, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21941-590, Brazil⁵; Hospital das Clínicas-HC, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP, Universidade de São Paulo-USP, Av. dos Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP CEP 14048-900, Brazil⁶; Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos-Biomanguinhos, FIOCRUZ/Rio, Av. Brasil n° 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ CEP 21040-360, Brazil⁷; Rega Institute, Catholic University of Leuven, Oude Markt 13, Leuven 3000, Belgium⁸; Departamento de Propedêutica Clínica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Alfredo Balena n° 190, Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG CEP 30130-100, Brazil⁹; and International Laboratory Network for Yellow Fever Vaccine Associated Adverse Events, Sealy Center for Vaccine Development, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas 77555-0609¹⁰

Received 16 September 2009/Returned for modification 5 October 2009/Accepted 3 November 2009

Yellow fever (YF) vaccines (17D-204 and 17DD) are well tolerated and cause very low rates of severe adverse events (YEL-SAE), such as serious allergic reactions, neurotropic adverse diseases (YEL-AND), and viscerotropic diseases (YEL-AVD). Viral and host factors have been postulated to explain the basis of YEL-SAE. However, the mechanisms underlying the occurrence of YEL-SAE remain unknown. The present report provides a detailed immunological analysis of a 23-year-old female patient. The patient developed a suspected case of severe YEL-AVD with encephalitis, as well as with pancreatitis and myositis, following receipt of a 17D-204 YF vaccination. The patient exhibited a decreased level of expression of Fc-γR in monocytes (CD16, CD32, and CD64), along with increased levels of NK T cells (an increased CD3⁺ CD16^{+/−} CD56^{+/−}/CD3⁺ ratio), activated T cells (CD4⁺ and CD8⁺ cells), and B lymphocytes. Enhanced levels of plasmatic cytokines (interleukin-6 [IL-6], IL-17, IL-4, IL-5, and IL-10) as well as an exacerbated *ex vivo* intracytoplasmic cytokine pattern, mainly observed within NK cells (gamma interferon positive [IFN-γ⁺], tumor necrosis factor alpha positive [TNF-α⁺], and IL-4 positive [IL-4⁺]), CD8⁺ T cells (IL-4⁺ and IL-5⁺), and B lymphocytes (TNF-α⁺, IL-4⁺, and IL-10⁺). The analysis of CD4⁺ T cells revealed a complex profile that consisted of an increased frequency of IL-12⁺ and IFN-γ⁺ cells and a decreased percentage of TNF-α⁺, IL-4⁺, and IL-5⁺ cells. Depressed cytokine synthesis was observed in monocytes (TNF-α⁺) following the provision of antigenic stimuli *in vitro*. These results support the hypothesis that a strong adaptive response and abnormalities in the innate immune system may be involved in the establishment of YEL-AND and YEL-AVD.

Yellow fever (YF) is a mosquito-borne viral hemorrhagic fever and is one of the most lethal viral diseases that remains an important public health problem in the regions of Africa and South America where it remains endemic (17). The easiness of international travel also makes YF a serious health threat to millions of travelers to areas where YF is endemic (8).

Highly effective, live attenuated 17D YF vaccines have been

available for decades and are considered to be among the safest vaccines worldwide (24). YF vaccines are produced by inoculation of embryonated chicken eggs with stock virus, harvesting, and freeze-drying with thermostabilizing components (1). The YF vaccines are delivered as a single subcutaneous dose and induce neutralizing antibodies in 90 to 99% of recipients after inoculation (4).

The 17D YF vaccines are well tolerated and cause a very low rate of adverse events postvaccination (21). Less than 25% of vaccinees develop mild systemic symptoms, which may include headache, myalgia, discomfort at the site of vaccination, or low-grade fever, 2 to 6 days after vaccination (17). Despite the strong safety profile of the 17D YF vaccines, reports of rare yellow fever vaccine-associated serious adverse events (YEL-SAEs) have been described in the literature, including severe

* Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ/Minas, Avenida Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais 30190-002, Brazil. Phone: 55 31 33497764. Fax: 55 31 32953115. E-mail: andreat@cpqrr.fiocruz.br.

† These authors contributed equally to this work.
[∇] Published ahead of print on 11 November 2009.

allergic reactions, neurotropic adverse disease (YEL-AND), and viscerotropic disease (YEL-AVD) (5, 12, 13, 16, 22).

The mechanisms underlying the development of these adverse events remain unknown. Distinct hypotheses have been postulated to explain the basis of YEL-SAE, which includes viral and host features (1, 2, 7, 9, 10, 11). The reversion of the 17D YF vaccine virus into a more virulent form and other genetic mutations do not seem to be probable causes of the adverse events, since the YF virus isolated from patients with YEL-SAEs have rarely shown a nucleotide sequence different from that of the original 17D YF vaccine strain (7, 9). It is considered that host factors, mainly host immune responses to the 17D YF vaccine, may represent the major causes of YEL-SAEs (1, 2, 9, 10, 11).

Increasing age, a history of thymus disorder, and immunocompromise are considered risk factors for the development of YEL-SAEs (2, 10, 13). However, several cases with unknown risk factors have been reported, suggesting the involvement of other host immunological features. A recent study with European patients with YEL-SAEs following 17D YF vaccination illustrated the release of sets of proinflammatory cytokines and chemokines different from the sets of cytokines released from vaccinees who did not experience side effects (1). Nevertheless, the specific role of distinct immunological events in the pathogenesis of YEL-SAEs still needs to be clarified.

This report provides a detailed immunological analysis of a 23-year-old female patient who developed combined suspected neurotropic and viscerotropic severe adverse events following 17D-204 YF vaccination.

CASE REPORT

On 4 February 2006, a 23-year-old female patient presented to an emergency room with 4 days of fever (temperature, up to 102.5°F), chills, nausea, vomiting, fatigue, myalgias, and arthralgia and one episode of loose bowel movements. She took acetaminophen (Tylenol) *pro re nata* for fever. On the morning of presentation, her symptoms had improved, but she noticed a pruritic rash on her trunk and extremities. She reported feeling itchy the night before the onset of the rash. She was given acetaminophen and diphenhydramine (Benadryl), resulting in improvement of the fever and the rash. Her medical history revealed a diagnosis of a partial complement 4 (C4) deficiency; cutaneous lupus erythematosus; and allergies to penicillin, cephalosporin, and sulfa drugs.

On 27 January 2006, while she was in the United States, she received 17D-204 vaccine (YF-Vax) in preparation for her travel to Brazil. Upon admission on 4 February, the medical examination revealed an intermittent tinnitus; black spots in visual fields; multiple petechiae on the upper palate; and a maculopapular rash on the trunk, extremities, and face in association with a slightly tender mid-lower abdomen under palpation of the abdomen without rebound or guarding. The patient did not have blurry vision or eye irritation, a sore throat, cough, shortness of breath, neurological deficits, bleeding or bruising, oral ulcers, skin sloughing, lymphadenopathy, or genitourinary complaints.

The physical examination demonstrated a temperature of 98.6°F, a pulse of 88 beats per minute, a blood pressure of 110/55 mm Hg, and a respiration rate of 16 breaths per minute.

The patient was alert and was oriented in place, time, and space. Laboratory records showed normal ranges for the white blood cell count ($3.5 \times 10^3/\text{mm}^3$) with normal differential counts (neutrophils, 55%, or $1,925/\text{mm}^3$; eosinophils, 6%, or $210/\text{mm}^3$; basophils, 1%, or $35/\text{mm}^3$; lymphocytes, 27%, or $945/\text{mm}^3$; monocytes, 11%, or $385/\text{mm}^3$), the hemoglobin concentration (13 mg/dl), hematocrit (37%), and platelet counts ($173,000/\text{mm}^3$); and normal electrolyte levels (sodium, 138 mEq/liter; potassium, 3.5 mEq/liter; chloride, 104 mEq/liter; bicarbonate, 26 mEq/liter); as well as a normal range of values for biochemical parameters (glucose concentration, 104 mg/dl; blood urea nitrogen concentration, 7 mg/dl; creatinine concentration, 0.7 mg/dl; aspartate aminotransferase concentration, 25 U/liter; alanine aminotransferase concentration, 25 U/liter; albumin concentration, 3.3 mg/dl). The patient was positive for antinuclear antibody with a speckled pattern and anti-double-stranded DNA negative. Her C3 concentration was 129 mg/dl, her C4 concentration was <1 mg/dl, she was anti-cardiolipin IgG and IgA negative, and her IgM level was 21 mg/dl (an IgM level of 20 to 80 mg/dl is low to medium positive). Because of a suspected allergic reaction, she was treated with acetaminophen and diphenhydramine. She was kept overnight for observation.

On 5 February 2006, she remained afebrile; however, a maculopapular rash was observed, predominantly on her chest and arms. An allergist defined the rash as a likely case of viral exanthema. The rash was noted to be 80% improved after treatment with diphenhydramine. She was then discharged with a prescription for diphenhydramine. Her laboratory data were within the normal ranges.

On 10 February 2006, she traveled to Rio de Janeiro, Brazil, and developed a headache on the overnight flight. On 12 February 2006, which was day 16 following the 17D-204 YF vaccination, she woke up with an excruciating headache but no fever. She went to the Universidade Federal do Rio de Janeiro Hospital for a medical consultation, where she presented with a generalized tonic-clonic seizure. Upon admission she was alert; however, she developed aphasia. Her body temperature was 97.5°F, her pulse was 99 beats per minute, and her respiratory rate was 20 breaths per minute. The patient's blood pressure was 90/60 mm Hg. At first, the patient appeared to be only slightly ill. No rash, petechiae, or lymphadenopathy was detected; and her mouth and oropharynx were normal. The neck was not rigid, and Kernig's sign was absent. The lungs, heart, abdomen, arms, and legs were normal. A neurological examination revealed no abnormalities. Her urine was normal. Hematological laboratory values showed leukocytosis with a normal differential count, and the other values and electrolyte values were normal. Lumbar puncture revealed a protein concentration of 40 mg/dl and a glucose concentration of 49 mg/dl, and staining of a specimen of cerebrospinal fluid (CSF) disclosed a leukocyte count of $150/\text{mm}^3$ with 77% neutrophils (concentration, $11.5/\text{mm}^3$). A computed tomographic (CT) scan of the brain with the intravenous injection of contrast material showed brain edema. An electroencephalographic examination revealed generalized low-amplitude slowing; no epileptiform activity or organized electroencephalographic seizures were seen. Specimens of blood were obtained for culture; and the administration of meropenem, acyclovir, steroids, phe-

nytoin, and acetaminophen was initiated. Shortly after admission, the fever subsided.

On the morning of the second day after admission, no rash or lymphadenopathy was detected. Her speech had returned but remained poor. Laboratory values were normal, despite C4 levels close to the lower limit of the normal range. A magnetic resonance imaging (MRI) study of the brain, performed before and after the intravenous administration of contrast, showed a subtle hyperintensity on fluid-attenuated inversion-recovery images in the head of the left *corpus caudatus* and the frontal cortex. The sizes of the ventricles, sulci, and cisterns were appropriate for the patient's age. There was no abnormal fluid collection, intracranial bleeding, midline shift, mass effect, or focal infarction; and the flow voids of the major vessels were patent. Subsequently, the treatments with meropenem and steroids were discontinued.

On the third day of admission, her condition evolved with a fever (maximal axillary temperature, 99.7°F), headache, agitation, mental confusion, poor speech, and no motor deficits associated with the muscle ache and abdominal pain. The laboratory results, however, showed increased levels of amylase (1,231 U/liter), lipase (8,633 U/liter), lactate dehydrogenase (LDH; 1,006 U/liter), creatine phosphokinase (CPK; 6,437 U/liter), and myoglobin (707 mg/dl). An abdominal CT scan (without contrast) showed a sizeable increase in the size of the pancreas, mainly the body and tail, with discrete tissue infiltration and free fluid in the abdominal cavity that could not be ascribed to fluid overload. The results of laboratory studies of the patient's serum showed nonreactive IgM antibodies to dengue virus and leptospire (as determined by enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA]); nonreactive IgM antibodies but reactive IgG antibodies to Epstein-Barr virus, rubella virus, and hepatitis A virus and nonreactive IgG antibodies to hepatitis B virus and hepatitis C virus (as determined by micro-particle enzyme immunoassay; Abbott); a reactive Monotest result (as determined by agglutination); nonreactive IgM antibodies to cytomegalovirus (as determined by ELISA); and negative PCR and nested PCR results by the use of oligonucleotides specific for the genomic LA and MIE regions of members of the *Herpesviridae* family. In light of the clinical signs and symptoms, the MRI and CT images, and serological findings, acyclovir was discontinued.

On the fourth day after admission, her body temperature became normal and the patient was still complaining of muscle pain, headache, and abdominal pain. There was mental confusion that alternated with drowsiness, accompanied by a new focal neurological manifestation characterized by discrete central facial and upper limb paresis. MRI revealed no abnormalities except a mild contrast enhancement in the meninges. The laboratory tests showed that the pancreatic enzyme, CPK, and LDH levels had further increased; and there was a mild increase in the aminotransferase levels dissociated from the levels of the other liver enzymes.

On the fifth day after admission, the patient became more responsive to commands, although she could not distinguish her right hand from her left hand. Motor deficits were no longer evident. She reported improvement in her headache and epigastric pain, and she recognized her location. All laboratory tests demonstrated a decrease in the levels of the enzymes mentioned above. Serum serology showed negative

results for neurotropic viruses, including eastern equine encephalitis virus, western equine encephalitis virus, Venezuelan equine encephalitis virus, St. Louis encephalitis virus, and Rocio virus. The patient was negative for mumps virus neutralizing antibodies (as determined by the plaque reduction neutralization test [PRNT] titer, <1:5). Serology for yellow fever virus showed a negative CSF IgM result but a positive serum IgM result (as determined by M antibody capture ELISA). Yellow fever virus neutralizing antibodies in serum (PRNT) were positive at 3,335 mIU/ml. The yellow fever virus genome was not detected in CSF or serum samples (by reverse transcription-PCR [RT-PCR]). Yellow fever virus was not isolated following the inoculation of serum into Vero cell cultures, C6/36 cell cultures, or suckling mice.

On the sixth day after admission, the patient improved clinically, was fully oriented, and talked normally; but she still complained of headache and muscle aches but not epigastric pain. The clinical examination was completely normal. The pancreatic enzyme levels were very close to the upper limit of the normal range, and a liquid diet was started. An MRI study of the abdomen performed before and after intravenous administration of contrast material showed a mild increase in the size of the pancreas, mainly in the body and the tail, without necrosis or other abnormalities. There was a slight fluctuation in the serum lipase levels.

On the seventh day after admission, she continued to improve clinically. She tolerated the liquid diet without nausea or pain. However, the discrete increase in the serum lipase level remained. An MRI study of the abdomen performed before and after the intravenous administration of contrast material showed a mild increase in the size of the pancreas, mainly in the body and the tail, without necrosis or other abnormalities.

On the eighth day after admission, the patient was fully oriented and continued to be asymptomatic, showing normal serum amylase levels and only a slight increase in serum lipase levels. Cultured specimens of blood and cerebrospinal fluid were sterile.

On the ninth day after admission, the patient was alert and lucid. A new neurological sign was observed and consisted of a prominent action and postural tremor in the tongue and palate; this was more evident when the tongue was stretched out.

On the tenth hospital day the patient ate well and no longer requested acetaminophen for headache. The tongue action tremor persisted but was better than it was on the day before. She was discharged on the following day.

Tentative diagnosis. Considering the combined clinical and laboratory data, the diagnosis for this patient was YEL-SAEs with prominent encephalitis and a residual tongue tremor associated with an important case of pancreatitis and rhabdomyolysis.

MATERIALS AND METHODS

With the objective of characterizing the immune events underlying the unusual presentation of a combined neurotropic and viscerotropic adverse event following 17D-204 YF vaccination, the immunological status of the patient described here was investigated by detailed immunophenotypic analysis by flow cytometry with a blood sample collected on day 16 following the 17D YF vaccination. The immunological parameters were compared with the reference values (RVs) for peripheral blood leukocyte subsets taken at day 15 after 17DD vaccination from healthy volunteers without adverse events that presented with mean positive PRNT values of $3,699 \pm 400$ mIU/ml.

Biological samples. A 10-ml blood sample was collected from the patient and placed into Vacutainer tubes containing sodium heparin (Becton Dickinson, San Jose, CA) 16 days after YF 17D vaccination.

Peripheral blood samples (10 ml each) from 10 healthy volunteers were collected and placed into Vacutainer tubes containing sodium heparin (Becton Dickinson) 15 days after YF 17DD vaccination, and the values for these blood samples were considered the RVs.

Fresh whole-blood aliquots were used for the *ex vivo* analysis of leukocyte subsets and activation status, as well as the analysis of the intracytoplasmic cytokine pattern following short-term whole-blood culture *in vitro*. Plasma samples were obtained by centrifugation of fresh whole-blood aliquots at $900 \times g$ for 10 min at 4°C, and the samples were stored at -70°C for analysis of plasmatic chemokines and cytokines.

Ex vivo analysis of leukocyte subsets: frequency, activation status, and chemokine receptor expression. Immunophenotypic analysis of peripheral blood leukocytes was performed by flow cytometry, as described previously (14, 15, 23). Briefly, 100- μ l aliquots of heparin-anticoagulated blood were dispensed into 5-ml polystyrene tubes (Falcon; BD Pharmingen, San Diego, CA) and stained with 5 μ l of undiluted monoclonal antibodies (MAbs) conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), or tricolor (TC) specific for cell surface markers, including CD3, CD4, CD5, CD8, CD14, CD16, CD18, CD19, CD23, CD25, CD28, CD32, CD38, CD54, CD62L, CD64, and CD69 and HLA-DR, CXCR3, CXCR4, CCR2, CCR3, and CCR5, all of which were from BD Pharmingen or Caltag (Burlingame, CA). The samples were treated by gentle vortexing and they were incubated in the dark for 30 min at room temperature. Following incubation, the samples were treated by gentle vortexing with 2 ml of fluorescence-activated cell sorting (FACS) lysing solution (BD Pharmingen) and were reincubated for an additional 10 min at room temperature in the dark. After erythrocyte lysis was completed, the samples were centrifuged at $600 \times g$ for 7 min at room temperature, the supernatant was discarded, and the cell pellet was washed twice with 2 ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.01% sodium azide. Cell preparations were fixed in 200 μ l of FACS fix solution (10 g/liter paraformaldehyde, 1% sodium cacodylate, 6.65 g/liter sodium chloride, 0.01% sodium azide) and stored at 4°C in the dark prior to flow cytometry analysis, which was performed within 24 h. For data acquisition and analyses, a total of 10,000 events per tube were acquired with a FACSCalibur flow cytometer and CELLQuest software (Becton Dickinson) properly set up to measure forward light scatter (FSC) and side light scatter (SSC) as well as FITC (FL-1), PE (FL-2), and TC (FL-3) fluorescence. Distinct gating strategies were used to analyze the frequency of each leukocyte subset, as described elsewhere (14, 15, 23).

Analysis of plasmatic chemokines and cytokines. A cytometric beads array (CBA) immunoassay kit (BD Biosciences) was used for the semiquantitative analysis of plasmatic chemokines and cytokines, including CXCL-8, CCL-2, CCL-5, CXCL-10, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-12, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and IL-10, as recommended by the manufacturer and as described previously (19). A sandwich ELISA was used for quantitative analysis of plasmatic IL-17 (Biosource, Nivelles, Belgium) as well as IL-23 and transforming growth factor β (TGF- β ; Bender Medsystems, Vienna, Austria), as recommended by the manufacturers.

Analysis of intracytoplasmic cytokine pattern following short-term whole-blood culture *in vitro*. The analysis of intracytoplasmic cytokines in peripheral blood leukocyte subsets was performed as described by Peruhype-Magalhães et al. (19). The cytokine profile was analyzed after short-term incubation *in vitro* in the absence (control cultures) or the presence of the 17DD YF vaccine antigen as an exogenous stimulus. Briefly, 500- μ l aliquots of heparinized peripheral blood were dispensed into individual 14-ml polypropylene tubes (Falcon; BD Pharmingen) and incubated for 6 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in the presence of 550 μ l of RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) as the control culture or in the presence of 500 μ l of RPMI 1640 (Gibco) plus 50 μ l live attenuated 17DD YF vaccine (lot 02UVFB005Z; BioManguinhos-FIOCRUZ) at a final concentration of 10⁶ viral particles/ml. Following incubation, 10 μ g/ml of brefeldin A (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) was added and the samples were reincubated for 4 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. After incubation, the cultures were treated with 2 mM EDTA (Sigma) and were kept at room temperature for 15 min. The culture samples were washed twice with 6 ml of FACS buffer (0.015 M PBS, 0.5% bovine serum albumin, 0.1% sodium azide) by centrifugation at $600 \times g$ for 7 min at room temperature. After resuspension in 1 ml of FACS buffer, 200- μ l aliquots were dispensed into 5-ml polystyrene tubes (Falcon; BD Pharmingen) and stained with anti-surface molecule MAbs, including antibodies to the surface molecules CD4, CD8, CD14, CD16, and CD19. After 30 min of incubation in the dark at room temperature, the samples were treated by gentle vortexing with 2 ml of FACS lysing solution

(BD Pharmingen) and were reincubated for 10 min at room temperature in the dark. After erythrocyte lysis was complete, the samples were centrifuged at $600 \times g$ for 7 min at room temperature, the supernatant was discarded, and the cell pellet was resuspended and kept for 10 min at room temperature in the dark with 2 ml of FACS permeabilizing solution containing FACS buffer supplemented with 0.5% saponin. Following incubation, the samples were centrifuged at $600 \times g$ for 7 min at room temperature, the supernatant was gently decanted, and the cell pellet was washed with 3 ml of FACS buffer. After centrifugation, the cells were resuspended in 200 μ l of FACS buffer and were distributed in 30- μ l aliquots over 96-well U-bottom microtiter plates. The cells were then stained with 20 μ l of PE-labeled anti-cytokine MAbs, including MAbs to gamma interferon (IFN- γ), TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10, and IL-12, at a final concentration of 25 μ g/ml. The MAbs had previously been diluted in sterile FACS permeabilizing solution by incubation for 30 min at room temperature in the dark. The cells were then washed twice, first with 150 μ l of FACS permeabilizing solution and then with 200 μ l of FACS buffer. The cell preparation was fixed in 200 μ l of FACS fix solution and stored at 4°C in the dark prior to flow cytometry analysis, which was performed within 24 h. A total of 30,000 events per tube were acquired with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) properly set up to detect FSC and SSC as well as FITC (FL-1), PE (FL-2), and TC (FL-3) fluorescence. The CELLQuest software provided by the manufacturer was used for data acquisition and analysis. Distinct gating strategies were used to analyze the cytokine profiles of the specific leukocyte subpopulations (19). Selective analysis of neutrophils was performed by establishing a specific scatter gate by using the combination of anti-cell surface antigens and laser SSC for discrimination of the neutrophils, and the neutrophils were gated as SSC^{High} CD16^{High} (high granularity and high CD16 expression). Analysis of the monocytes was performed by staining immunophenotyping with SSC versus FL-1 and anti-CD14-TC dot plots to select the monocytes as SSC^{Low} CD14^{High} cells. Identification of the natural killer (NK) cells, T CD4⁺ or T CD8⁺ lymphocytes, and B cells was initially performed by using a lymphocyte scatter gate setup and FSC versus SSC dot plots, followed by a phenotype gating strategy with anti-CD16-FITC, anti-CD19-TC, anti-CD4-TC, and anti-CD8-FITC MAbs to select a given cell subpopulation. The frequency of cytokine-expressing cells was determined by using quadrant statistics over FL-2 and anti-cytokine-PE versus FL-1 and anti-cell surface marker-FITC or FL-3/anti-cell surface marker-TC dot plots. All results for the different gated leukocyte subpopulations were expressed as a percentage of the cytokine-positive cells.

Statistical analysis. Data analysis was performed, and the data were considered to be statistically significant when the values for the patient were outside of the mean \pm 2 standard deviations (SDs) of the RV range. Statistical significance was also considered when the values for the patient were outside the range of 0.5 to 2.0 times the mean RV.

RESULTS

Ex vivo analysis of leukocyte subsets: frequency, activation status, and chemokine receptor expression. The *ex vivo* analysis of the phenotypic features of the circulating leukocytes demonstrated that the patient's monocytes displayed lower levels of expression of Fc- γ R (CD16, CD32, and CD64) compared to the RVs (Table 1). Additionally, a higher frequency of NK T cells (CD3⁺ CD16^{+/−} CD56^{+/−}/CD3⁺ ratio) was the hallmark of the innate immunity of the patient.

An increased frequency of activated CD4⁺ T cells (CD69⁺ and HLA-DR positive [HLA-DR⁺]), in addition to increased levels of CD54⁺ and CD38⁺ cells, decreased levels of CD62L⁺ events within the CD4⁺ T cells, as well as the lower levels of expression of CD18 by CD4⁺ T cells compared to the RVs, was observed in the case patient. A reduced frequency of regulatory T cells (CD4⁺ CD25^{High}) along with a lower level of expression of IL-10 receptor (IL-10R) by CD4⁺ T cells, was also observed (Table 1). Moreover, analysis of CD8⁺ T cells also demonstrated increased levels of activated cells and a high percentage of CD54⁺ cells, a lower frequency of CD62L⁺ cells, and a reduced level of expression of CD18 compared to the RVs (Table 1).

An increased frequency of activated B cells (CD19⁺

TABLE 1. *Ex vivo* analysis of peripheral blood leukocyte subsets and activation status in the patient with combined neurotropic and viscerotropic disease following 17D YF vaccination

Cell type	Cell phenotype	Value ^a	
		RV	Patient
Monocytes	CD14 ⁺ CD16 ⁺ DR ⁺ /CD14 ⁺ CD16 ⁺	71.0 ± 14.8	54.0
	CD16 (MFI) in CD14 ⁺	101.0 ± 48.0	↓ 20.0*
	CD32 (MFI) in CD14 ⁺	215.0 ± 47.0	↓ 39.0**
	CD64 (MFI) in CD14 ⁺	91.0 ± 25.0	↓ 28.0**
NK cells	CD3 ⁻ CD16 ^{-/+} CD56 ^{-/+}	15.0 ± 7.5	12.0
	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁻ /NK cells	11.0 ± 7.1	7.0
	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺ /NK cells	78.0 ± 9.6	93.0
NK T cells	CD3 ⁺ CD16 ^{+/-} CD56 ^{+/-} /CD3 ⁺	12.0 ± 3.9	↑ 40.0**
T cells	CD3 ⁺	67.0 ± 7.2	66.0
	CD4 ⁺	39.0 ± 6.2	38.0
	CD18 (MFI) in CD4 ⁺	40.0 ± 9.9	↓ 9.0**
	CD4 ⁺ CD54 ⁺ /CD4 ⁺	4.0 ± 2.2	↑ 24.0**
	CD4 ⁺ CD62L ⁺ /CD4 ⁺	68.0 ± 8.9	↓ 23.0**
	CD4 ⁺ CD69 ⁺ /CD4 ⁺	3.0 ± 1.8	↑ 10.0**
	CD4 ⁺ CD38 ⁺ /CD4 ⁺	41.0 ± 9.8	↓ 10.0**
	CD4 ⁺ CD28 ⁺ /CD4 ⁺	96.0 ± 1.8	95.0
	CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ /CD4 ⁺	4.0 ± 2.0	↑ 11.0**
	CD4 ⁺ CD25 ^{High}	1.9 ± 0.9	↓ 0.8*
	IL-10R (MFI) in CD4 ⁺	10.7 ± 5.5	↓ 3.0*
	CD8 ⁺	28.0 ± 5.8	28.0
	CD18 (MFI) in CD8 ⁺	68.0 ± 20.4	↓ 10.0**
	CD8 ⁺ CD54 ⁺ /CD8 ⁺	6.0 ± 4.0	↑ 18.0**
	CD8 ⁺ CD62L ⁺ /CD8 ⁺	48.0 ± 6.4	↓ 16.0**
	CD8 ⁺ CD69 ⁺ /CD8 ⁺	11.0 ± 2.8	10.0
	CD8 ⁺ CD38 ⁺ /CD8 ⁺	54.0 ± 21.2	64.0
	CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ /CD8 ⁺	5.0 ± 2.4	6.0
	CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺	59.0 ± 12.1	40.0
IL-10R (MFI) in CD8 ⁺	17.0 ± 6.6	11.0	
B cells	CD19 ⁺	13.0 ± 4.7	17.0
	CD19 ⁺ CD5 ⁺ /CD19 ⁺	24.0 ± 5.5	22.0
	CD19 ⁺ CD5 ⁻ /CD19 ⁺	75.0 ± 8.2	78.0
	CD19 ⁺ CD23 ⁺ /CD19 ⁺	49.0 ± 15.3	53.0
	CD19 ⁺ CD69 ⁺ /CD19 ⁺	12.0 ± 3.6	↑ 54.0**
	CD32 (MFI) in CD19 ⁺	160.0 ± 32.0	↓ 11.0**

^a RV, RVs for peripheral blood leukocyte subset frequencies observed 15 days after 17DD vaccination in the absence of adverse reactions ($n = 10$); Patient, peripheral blood leukocyte subset frequencies observed in the patient with combined neurotropic and viscerotropic disease following 17D YF vaccination. The results are expressed as the mean percentage ± SD of positive cells unless MFI is indicated, in which case the results are expressed as the mean MFI ± SD for the expression of a given cell surface marker within gated lymphocytes. *, statistical significance was considered when the values for the patient were outside of the RV range (mean ± 2 SDs); **, additional statistical significance was considered when the values for the patient were outside of the range of 0.5 to 2.0 times the mean RVs. ↑ and ↓, increase and decrease in the values, respectively, in comparison to the RVs.

CD69⁺), in addition to a reduced level of expression of CD32 by B cells, was the major phenotypic feature suggesting the high level of activation of B cells, as determined by comparison of the levels of activation with the RVs (Table 1).

The results of the analysis of chemokine receptor expression by monocytes and T lymphocytes are presented in Table 2. The data analysis demonstrated that the T cells from the patient presented a decreased level of expression of

TABLE 2. *Ex vivo* expression of chemokine receptors by peripheral blood leukocyte subsets in the patient with combined neurotropic and viscerotropic disease following 17D YF vaccination

Cell type	Chemokine receptor	Value ^a	
		RV	Patient
Monocytes	CXCR4	8.34 ± 2.33	8.7
	CXCR3	10.70 ± 2.54	9.25
	CCR5	8.91 ± 3.17	9.80
	CCR2	9.93 ± 4.12	10.29
CD4 ⁺ T cells	CXCR4	4.50 ± 1.02	4.70
	CXCR3	26.68 ± 4.67	↓ 4.33**
	CCR5	3.34 ± 1.71	3.75
	CCR2	2.80 ± 0.60	3.26
	CCR3	2.89 ± 0.81	3.46
CD8 ⁺ T cells	CXCR4	7.99 ± 1.99	5.06
	CXCR3	32.73 ± 6.50	↓ 5.59**
	CCR5	5.38 ± 1.74	3.84
	CCR2	4.65 ± 1.71	3.53
	CCR3	3.93 ± 0.73	3.93

^a RV, RVs for chemokine receptor expression by peripheral blood leukocyte subsets observed 15 days after 17DD vaccination in the absence of adverse reactions ($n = 10$); Patient, values for chemokine receptor expression by peripheral blood leukocyte subset frequencies observed in the patient with combined neurotropic and viscerotropic adverse events temporally associated with 17D vaccination YF. The results are expressed as the mean percentage ± SD of positive cells unless MFI is indicated, in which case the results are expressed as the mean MFI ± SD for the expression of a given cell surface marker within gated lymphocytes. *, statistical significance was considered when the values for the patient were outside of the RV range (mean ± 2 SDs); **, additional statistical significance was considered when the values for the patient were outside of the range of 0.5 to 2.0 times the mean RVs. ↑ and ↓, increase and decrease in the values, respectively, in comparison to the RVs.

CXCR3 by both CD4⁺ and CD8⁺ T cells in comparison with the RVs (Table 2).

Analysis of plasmatic chemokines and cytokines. Semiquantitative analysis demonstrated that the patient's plasma exhibited a chemokine profile with values comparable to the RVs: high levels of CXCL-8 (IL-8) and CCL-5 (RANTES) and low levels of CCL-2 (monocyte chemoattractant protein 1 [MCP-1]), and CXCL-10 (interferon-inducible protein 10) (Fig. 1A). Additional analysis demonstrated that YEL-AND resulted in a general exacerbated cytokine pattern, with higher levels of plasmatic IL-6, IL-17, IL-4, IL-5, and IL-10, despite the lower levels of TNF- α , in comparison to the RVs (Fig. 1B).

Analysis of intracytoplasmic cytokine pattern following short-term whole-blood culture *in vitro*. Analysis of the *ex vivo* leukocyte intracytoplasmic cytokine pattern of control cultures revealed increased levels of IFN- γ -positive (IFN- γ ⁺), TNF- α -positive (TNF- α ⁺), and IL-4-positive (IL-4⁺) NK cells (Fig. 2A). On the other hand, in the presence of the 17DD YF vaccine antigenic stimulus, the patient's leukocytes exhibited decreased levels of TNF- α ⁺ monocytes compared to the RVs. Additional analysis also revealed increased levels of IFN- γ ⁺ in NK cells in comparison to the RVs (Fig. 2B).

Analysis of lymphocytes from the patient showed increased levels of IL-12⁺ CD4⁺ and IFN- γ ⁺ CD4⁺ cells and lower levels of TNF- α ⁺ CD4⁺, IL-4⁺ CD4⁺, and IL-5⁺ CD4⁺ T cells in comparison to the RVs. Analysis of CD8⁺ T-cells revealed increased levels of IL-4⁺ and IL-5⁺ cells. The B-cell cytokine profile demonstrated increased levels of TNF- α ⁺, IL-4⁺, and IL-10⁺ cells (Fig. 2C). Analysis in the presence of or after the

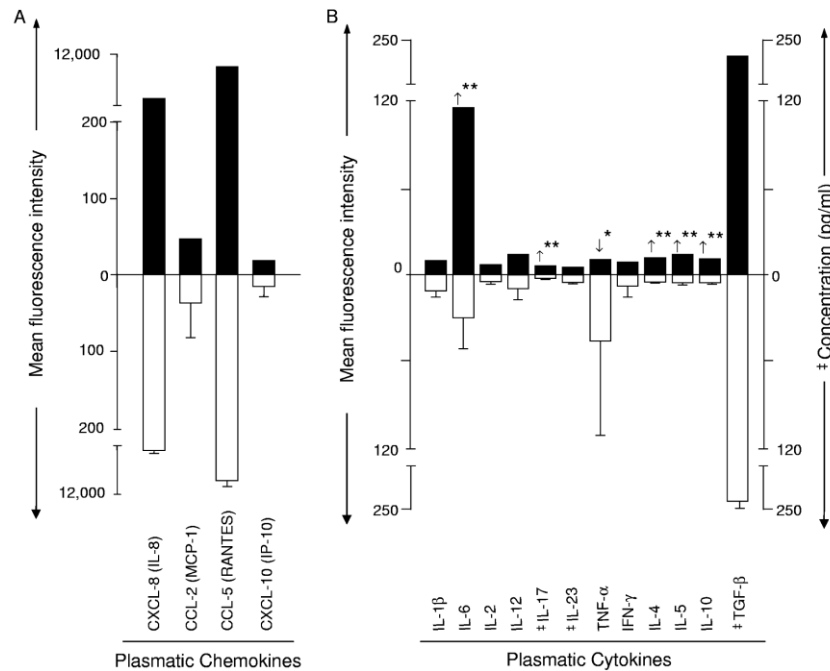


FIG. 1. Plasmatic chemokine (A) and cytokine (B) patterns observed in the patient with combined neurotropic and viscerotropic disease following 17D YF vaccination (■) compared to the reference values observed 15 days after 17DD YF vaccination in the absence of adverse reactions (□). The results are expressed as the mean fluorescence intensities \pm SDs for CXCL-8, CCL-2, CCL-5, CXCL-10, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , and IL-10 or the mean concentrations (pg/ml) \pm SDs for IL-17, IL-23, and TGF- β . **, statistical significance was considered when the values for the patient were outside of the reference value range (mean \pm 2 SDs); *, additional statistical significance was considered when the values for the patient were outside the range of 0.5 to 2.0 times the mean RV; \uparrow , increase in comparison to the reference value.

17DD YF vaccine antigenic stimulus demonstrated that lymphocytes from the patient showed increased percentages of IL-12 $^{+}$ CD4 $^{+}$ and IL-5 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T cells. Analysis of the CD8 $^{+}$ T cells revealed increased levels of IL-12 $^{+}$ and TNF- α $^{+}$ cells, in addition to an increase in the levels of IL-4 $^{+}$ and IL-5 $^{+}$ cells. Analysis of the B-cell cytokine profile demonstrated increased levels of TNF- α $^{+}$ cells (Fig. 2D).

Together, these data demonstrate that the patient exhibited an exacerbated cytokine pattern with an enhanced frequency of cytokine-positive cells, mainly observed within NK cells, CD8 $^{+}$ T cells, and B lymphocytes, regardless of the experimental conditions under which they were evaluated (under the control condition or with the 17DD YF vaccine stimulus). The analysis of CD4 $^{+}$ T cells revealed the most complex profile, with assorted changes being detected when the control and 17DD YF vaccine-stimulated cultures were considered. On the other hand, a depressed level of TNF- α synthesis was observed in monocytes after antigenic stimulation.

DISCUSSION

The 17D YF vaccines (17D-204 and 17DD) are well tolerated, and the rate of serious adverse events is very low. Cases of encephalitis and other neurotropic adverse events (YEL-

AND) following YF vaccination are estimated to occur in 0.4 per 100,000 vaccinees (16).

The clinical presentation of YEL-AND includes a high-grade fever (temperature, $\geq 100.5^{\circ}\text{F}$) and headache for more than 24 h. It may also be accompanied by focal neurological dysfunction, including, but not limited to, ataxia, aphasia, and paresis. More severe cases could show mental status changes, confusion, lethargy, personality changes, the new onset of seizures, or a recurrence of previously controlled seizures (16).

The clinical course of the adverse events for the patient described here is unusual in comparison to the profiles of the cases reported so far. Indeed, the patient presented with overt pancreatitis and moderate liver involvement, clinical signs not yet described in the cases reported to date. In addition, whereas the neurological signs and symptoms were presented by day 14, the viscerotropic signs and symptoms of pancreatitis and rhabdomyolysis came into the clinical picture only belatedly, on day 22. (It is unclear on how the mild mid-lower abdominal pain that occurred 9 days following vaccination should be interpreted.) On the basis of the clinical and laboratory data, however, a diagnosis of a suspected combined neurotropic and viscerotropic syndrome may be made.

Following 17D YF vaccination, most primary vaccinees cause low level of and transient viremia. It is noteworthy that

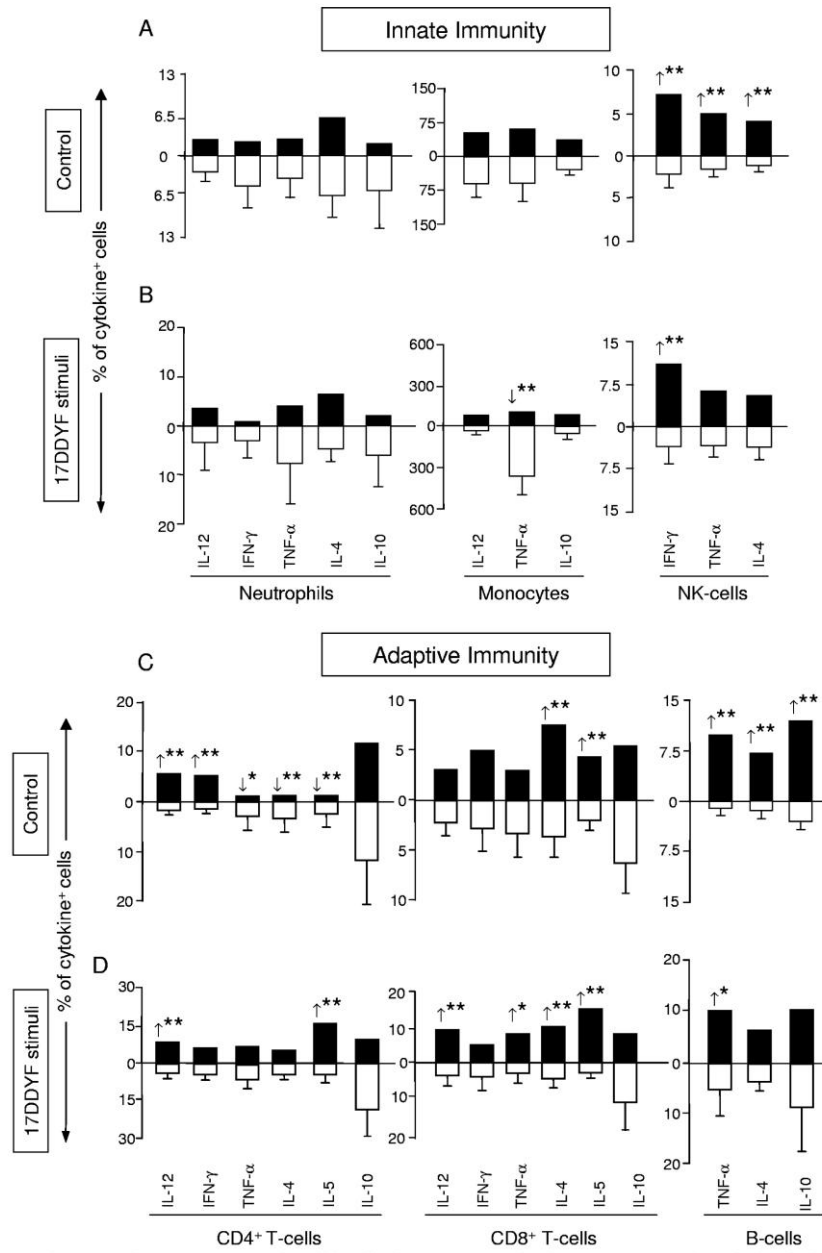


FIG. 2. Intracytoplasmic cytokine pattern of peripheral blood leukocytes associated with innate immunity (A and B) and adaptive immunity (C and D) observed in the patient with combined neurotropic and viscerotropic disease following 17D YF vaccination (■) compared to the reference values observed 15 days after 17DD vaccination in the absence of adverse reactions (□) after short-term *in vitro* incubation in the absence of exogenous stimuli (A and C) or in the presence of 17DD antigen stimulation (B and D). For each leukocyte subset (neutrophils, monocytes, NK cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and B cells), the results are expressed as the mean percentage of cytokine-positive cells within 1,000 gated events ($\frac{0}{100}$) \pm SD. **, statistical significance was considered when the values for the patient were outside of the reference value range (mean \pm 2 SDs); *, additional statistical significance was considered when the values for the patient were outside the range of 0.5 to 2.0 times the mean RV. \uparrow and \downarrow , increase and decrease in the values, respectively, compared to the reference values.

Downloaded from cxi.asm.org by on January 1, 2010

the viral load in the blood from 17D YF-immunized persons is far below the infection threshold for blood-feeding mosquitoes, reflecting the restricted replication of the attenuated virus. On the other hand, YF virus has been detected in the blood, serum, plasma, heart, liver, spleen, kidney, lung, brain, spinal cord, and skin of patients with YEL-SAEs (1, 3, 6, 18). Occasionally, 17D YF virus has been detected in CSF, suggesting its involvement with the YEL-SAE, but it has recently been suggested that the neurological manifestations are due to the immune response to the 17D YF virus infection rather than the direct action of the virus through the central nervous system.

In this study, the 17D YF virus genome was not detected in either CSF or serum samples (as determined by RT-PCR), nor was the 17D YF virus isolated following the inoculation serum into Vero cell cultures, C6/36 cell cultures, or suckling mice. Therefore, the case reported here may be considered a suspected case of combined neurotropic and viscerotropic adverse events following 17D YF vaccination.

It has previously been reported that the titers of neutralizing antibodies against 17D YF virus in patients with YEL-SAEs were considerably higher than those observed in healthy patients (3, 6, 18). However, the titers of neutralizing antibodies identified in the patient described here resembled the titers observed in healthy vaccinees who did not experience any side effects (4).

The occurrence of YEL-SAEs has been associated with increasing age, a history of thymus disorder, and immunocompromise; however, no apparent risk factor could be identified for several cases. The patient described here exhibited some abnormalities in her cellular immune response compared to the immunological profile exhibited by time-matched first-time vaccinees who did not experience any adverse effects. Our data demonstrated that the patient had impaired FC- γ R expression in monocytes, despite a robust increase in the level of NK T cells, activated T cells (CD4⁺ and CD8⁺), and B lymphocytes. Additionally, enhanced levels of plasmatic cytokines together with exacerbated intracytoplasmic cytokines were mainly observed within NK cells, CD8⁺ T cells, and B lymphocytes. Analysis of the CD4⁺ T cells revealed a complex cytokine profile in control and 17DD YF-stimulated cultures. On the other hand, depressed TNF- α synthesis was observed in monocytes following antigenic stimulation. It is important to note that since the two vaccine substrains do not have identical sequences, it is possible that the immune response to routine immunization may not be identical for the two vaccinees.

It has recently been reported that YEL-SAEs are accompanied by robust antigen-specific T- and B-cell responses, so the adverse event is unlikely to be caused by impairment of the magnitude of adaptive immunity. On the contrary, the magnitude of this adaptive response might have been a result of the abnormalities in the innate immune system and a possible disruption of the CCR5-RANTES axis (20). Our data did not demonstrate changes in the levels of CCR5 expression on monocytes. However, we found an unexpected decrease in the levels of CXCR3 expression by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, which may suggest the internalization of CXCR3 following hyperactivation. CXCR3 is usually expressed in type 1 T cells, and it is speculated that the lower level of expression of CXCR3 is associated with the massive activation of T cells, since the CXCR3-ligand axis play an important role in T-lymphocyte

activation and recruitment and the subsequent amplification of inflammation in human diseases.

Although cytokines and chemokines may act as immune modulators in YEL-SAEs, their role is still not fully understood. It was shown that growth-related oncogene (GRO), MCP-1, TGF- β , and RANTES levels were moderately increased in one patient with YEL-AND, whereas healthy vaccinees who had no any adverse effects exhibited increases only in RANTES levels and had lower GRO, MCP-1, TGF- β , and TNF- β levels (1). Nevertheless, the specific roles of various cytokines and chemokines in the pathogenesis of YFV infection need to be further clarified.

Together, our findings support the hypothesis that a robust adaptive response and abnormalities in the innate immune system may be involved in the establishment of severe adverse events following primary 17D YF vaccination. Further research on the virus-host immune response is required to obtain a better understanding of the basis of this process.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was financially supported by Biomaguinhos (grant CC 05/2005), FAPEMIG grant 13962/2008, and the Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ-Minas. O.A.M.-F., A.T.-C., and D.S.-L. are grateful for CNPq research fellowships (PQ, PQ, and PDI, respectively). We thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities.

REFERENCES

- Bae, H. G., C. Domingo, A. Tenorio, F. de Ory, J. Muñoz, P. Weber, D. E. Teuwen, and M. Niedrig. 2008. Immune response during adverse events after 17D-derived yellow fever vaccination in Europe. *J. Infect. Dis.* 197:1577–1584.
- Barwick, R. 2004. History of thymoma and yellow fever vaccination. *Lancet* 364:936.
- Belsher, J. L., P. Gay, M. Brinton, J. DellaValla, R. Ridenour, R. Lanciotti, A. Pereygin, S. Zaki, C. Paddock, T. Querec, T. Zhu, B. Pulendran, R. B. Eidex, and E. Hayes. 2007. Fatal multiorgan failure due to yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease. *Vaccine* 25:8480–8485.
- Camacho, L. A., S. G. de Aguiar, M. D. S. Freire, M. D. L. Leal, J. P. do Nascimento, T. Iguchi, J. A. Lozana, and R. H. Farias. 2005. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines. *Rev. Saude Publica* 39:413–420.
- Chan, R. C., D. J. Penney, D. Little, I. W. Carter, J. A. Roberts, and W. D. Rawlinson. 2001. Hepatitis and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine. *Lancet* 358:121–122.
- Doblas, A., C. Domingo, H. G. Bae, C. L. Bohorquez, F. de Ory, M. Niedrig, D. Mora, F. J. Carrasco, and A. Tenorio. 2006. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease and death in Spain. *J. Clin. Virol.* 36:156–158.
- Engel, A. R., P. F. Vasconcelos, M. A. McArthur, and A. D. Barrett. 2006. Characterization of a viscerotropic yellow fever vaccine variant from a patient in Brazil. *Vaccine* 24:2803–2809.
- Expanded Programme on Immunization. 1996. Inclusion of yellow fever vaccine in the EPI. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 71:181–185.
- Jennings, A. D., C. A. Gibson, B. R. Miller, J. H. Mathews, C. J. Mitchell, J. T. Roehrig, D. J. Wood, F. Taffs, B. K. Sil, S. N. Whitby, P. D. Minor, T. P. Monath, and A. D. T. Barrett. 1994. Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine-associated human encephalitis. *J. Infect. Dis.* 169:512–518.
- Khromava, A. Y., R. B. Eidex, L. H. Weld, K. S. Kohl, R. D. Bradshaw, R. T. Chen, M. S. Cetron, and the Yellow Fever Vaccine Safety Working Group. 2005. Yellow fever vaccine: an updated assessment of advanced age as a risk factor for serious adverse events. *Vaccine* 23:3256–3263.
- Lawrence, G. L., M. A. Burgess, and R. B. Kass. 2004. Age-related risk of adverse events following yellow fever vaccination in Australia. *Commun. Dis. Intell.* 28:244–248.
- Lindsey, N. P., B. A. Schroeder, E. R. Miller, M. M. Braun, A. F. Hinckley, N. Marano, B. A. Slade, E. D. Barnett, G. W. Brunette, K. Horan, J. E. Staples, P. E. Kozarsky, and E. B. Hayes. 2008. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine* 26:6077–6082.
- Martin, M., T. F. Tsai, B. Cropp, G. J. Chang, D. A. Holmes, J. Tseng, W. J. Shieh, S. R. Zaki, I. A. Sanouri, A. F. Cutrona, G. Ray, L. H. Weld, and M. S. Cetron. 2001. Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases. *Lancet* 358:98–104.

14. Martins, M. A., M. L. Silva, A. P. Marciano, V. Peruhype-Magalhães, S. M. Eloi-Santos, G. L. Ribeiro, R. Correa-Oliveira, A. Homma, E. G. Kroon, A. Teixeira-Carvalho, and O. A. Martins-Filho. 2007. 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? *Clin. Exp. Immunol.* **148**:90–100.
15. Martins, M. A., M. L. Silva, S. M. Eloi-Santos, J. G. Ribeiro, V. Peruhype-Magalhães, A. P. Marciano, A. Homma, E. G. Kroon, A. Teixeira-Carvalho, and O. A. Martins-Filho. 2008. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine* **26**:1173–1184.
16. McMahon, A. W., R. B. Eidex, A. A. Marfin, M. Russell, J. J. Sejvar, L. Markoff, E. B. Hayes, R. T. Chen, R. Ball, M. M. Braun, M. Cetron, and Yellow Fever Working Group. 2007. Neurologic disease associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of 15 cases. *Vaccine* **25**:1727–1734.
17. Monath, T. P. 2001. Yellow fever: an update. *Lancet Infect. Dis.* **1**:11–20.
18. Munoz, J., A. Vilella, C. Domingo, J. M. Nicolas, F. de Ory, M. Corachan, A. Tenorio, and J. Gascon. 2008. Yellow fever-associated viscerotropic disease in Barcelona, Spain. *J. Travel Med.* **15**:202–205.
19. Peruhype-Magalhães, V., O. A. Martins-Filho, A. Prata, L. D. A. Silva, A. Rabello, A. Teixeira-Carvalho, R. M. Figueiredo, S. F. Guimarães-Carvalho, T. C. Ferrari, J. Van Weyenbergh, and R. Correa-Oliveira. 2006. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **146**:124–132.
20. Pulendran, B., J. Miller, T. D. Querec, R. Akondy, N. Moseley, O. Laur, J. Glidewell, N. Monson, T. Zhu, H. Zhu, S. Staprans, D. Lee, M. A. Brinton, A. A. Pereygin, C. Vellozzi, P. Brachman, Jr., S. Lalor, D. Teuwen, R. B. Eidex, M. Cetron, F. Priddy, C. del Rio, J. Altman, and R. Ahmed. 2008. Case of yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes. *J. Infect. Dis.* **198**:500–507.
21. Silveira-Lemos, D., M. A. Martins, M. L. Silva, A. Homma, A. Teixeira-Carvalho, and O. A. Martins-Filho. 2008. Insights on yellow fever immune response following natural infection and vaccination. *Curr. Trends Immunol.* **9**:1–14.
22. Vasconcelos, P. F., E. J. Luna, R. Galler, L. J. Silva, T. L. Coimbra, V. L. Barros, T. P. Monath, S. G. Rodrigues, C. Laval, Z. G. Costa, M. F. G. Vilela, C. L. S. Santos, C. M. O. Papaioordanou, V. A. F. Alves, L. D. Andrade, H. K. Sato, E. S. T. Rosa, G. B. Froguas, E. Lacava, L. M. R. Almeida, A. C. R. Cruz, I. M. Rocco, R. T. M. Santos, O. F. P. Oliva, and Brazilian Yellow Fever Vaccine Evaluation Group. 2001. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *Lancet* **358**:91–97.
23. Vitelli-Avelar, D. M., R. Sathler-Avelar, J. C. Dias, V. P. Pascoal, A. Teixeira-Carvalho, P. S. Lage, S. M. Eloi-Santos, R. Corrêa-Oliveira, and O. A. Martins-Filho. 2005. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3⁺ CD16-CD56⁺ natural killer T cells and CD4⁺ CD25^{High} regulatory T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **62**:297–308.
24. Wilson, M. E., L. H. Chen, and E. D. Barnett. 2004. Yellow fever immunizations: indications and risks. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **1**:34–42.

4.3 Artigo 3

O artigo científico apresentado a seguir corresponde ao objetivo específico: Caracterizar o índice de impacto do antígeno amarelo 17DD no panorama de citocinas em leucócitos circulantes, associado aos diferentes padrões de soroconversão em crianças.

Título: Cytokine Signatures of innate and adaptive immunity in 17DD Yellow Fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody.

Autores: Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA; Martins MA, Sathler Avelar R; Silveira-Lemos D, Camacho LAB, Martins RM, Maia MLS, Farias RHG, Freire MS, Galler R, Homma A, Ribeiro JGL, Lemos JAC, Auxiliadora-Martins M, Eloi-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO.

Revista: The Journal of Infectious Diseases. 2011;204(6):873-883.

Doi:10.1093/infdis/jir439

Cytokine Signatures of Innate and Adaptive Immunity in 17DD Yellow Fever Vaccinated Children and Its Association With the Level of Neutralizing Antibody

Maria Luiza-Silva,^{1,2} Ana Carolina Campi-Azevedo,¹ Mauricio Azevedo Batista,¹ Marina Angela Martins,¹ Renato Sathler Avelar,¹ Denise da Silveira Lemos,³ Luiz Antonio Bastos Camacho,⁴ Reinaldo de Menezes Martins,⁵ Maria de Lourdes de Sousa Maia,⁵ Roberto Henrique Guedes Farias,⁵ Marcos da Silva Freire,⁵ Ricardo Galler,⁵ Akira Homma,⁵ José Geraldo Leite Ribeiro,⁶ Jandira Aparecida Campos Lemos,⁶ Maria Auxiliadora-Martins,⁷ Silvana Maria Eloi-Santos,⁸ Andréa Teixeira-Carvalho,¹ and Olindo Assis Martins-Filho¹

¹Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, ²Centro de Pós-graduação, Ciências da Saúde - Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Minas Gerais, Belo Horizonte, ³Núcleo de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto - Morro do Cruzeiro, Ouro Preto, MG - Brazil; ⁴Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, ⁵Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos - FIOCRUZ - Rio de Janeiro, RJ - Brazil; ⁶Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG - Brazil; ⁷Hospital das Clínicas - HC, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP, Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil; ⁸Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG - Brazil

Background. The live attenuated yellow fever (YF) vaccines have been available for decades and are considered highly effective and one of the safest vaccines worldwide.

Methods. The impact of YF-17DD-antigens recall on cytokine profiles of YF-17DD-vaccinated children were characterized using short-term cultures of whole blood samples and single-cell flow cytometry. This study enrolled seroconverters and nonseroconverters after primovaccination (PV-PRNT⁺ and PV-PRNT⁻), seroconverters after revaccination (RV-PRNT⁺), and unvaccinated volunteers (UV-PRNT⁻).

Results. The analysis demonstrated in the PV-PRNT⁺ group a balanced involvement of pro-inflammatory/regulatory adaptive immunity with a prominent participation of innate immunity pro-inflammatory events (IL-12⁺ and TNF- α ⁺ NEU and MON). Using the PV-PRNT⁺ cytokine signature as a reference profile, PV-PRNT⁻ presented a striking lack of innate immunity proinflammatory response along with an increased adaptive regulatory profile (IL-4⁺CD4⁺ T cells and IL-10⁺ and IL-5⁺CD8⁺ T cells). Conversely, the RV-PRNT⁺ shifted the overall cytokine signatures toward an innate immunity pro-inflammatory profile and restored the adaptive regulatory response.

Conclusions. The data demonstrated that the overall cytokine signature was associated with the levels of PRNT antibodies with a balanced innate/adaptive immunity with proinflammatory/regulatory profile as the hallmark of PV-PRNT^{MEDIUM+}, whereas a polarized regulatory response was observed in PV-PRNT⁻ and a prominent proinflammatory signature was the characteristic of PV-PRNT^{HIGH+}.

Received 11 January 2011; accepted 2 May 2011.

Potential conflicts of interest: Six of the authors (R. M. M., M. L. S. M., R. H. G. F., M. S. F., R. G., and A. H.) are employed by the 17DD vaccine manufacturer (Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz) and 3 others worked in other units of Fundação Oswaldo Cruz (L. A. B. C., A. T.-C., and O. A. M.-F.). Bias from competing interest was prevented by (1) participation of members from the Minas Gerais State Health Secretary, with expertise in epidemiological surveillance in vaccine studies (José Geraldo Leite Ribeiro and Jandira Aparecida Campos Lemos) and 2 general clinical physicians with experience in infectious disease, 1 from the São Paulo University (Maria Auxiliadora-Martins) and another from the Federal University of Minas Gerais (Silvana Maria Eloi-Santos), that contributed with critical overview of the study design, volunteer immunization and medical care, blood sample collection, and supervision of data interpretation, working together with the Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines, which conducted the study; and (2) having 6 independent university professionals working as PhD students or postdoctorate

researchers in the field of infectious diseases (Maria Luiza-Silva; Ana Carolina Campi-Azevedo, Mauricio Azevedo Batista, Marina Angela Martins; Renato Sathler Avelar, and Denise da Silveira Lemos), responsible for blind sample handling and processing, data collection, and statistical analysis. All other authors: no conflicts.

Correspondence: Olindo Assis Martins-Filho, PhD, Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração - Centro de Pesquisas René Rachou, Avenida Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto - Belo Horizonte - Minas Gerais - 30 190-002 - Brazil (oamfilho@cpqrr.fiocruz.br).

The Journal of Infectious Diseases 2011;204:873-83

© The Author 2011. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com
0022-1899 (print)/1537-6613 (online)/2011/2046-0010\$14.00
DOI: 10.1093/infdis/jij439

Yellow fever (YF) remains an important public health problem and the 17D live, attenuated yellow fever virus vaccine constitutes the single most effective means of limiting impact of the disease [1–3]. The World Health Organization (WHO) recommends that persons aged >9 months who are traveling to or living in areas where yellow fever infection is officially reported should be vaccinated [4–8]. In Brazil, the YF-17DD vaccine is offered for free to every citizen by the National Immunization Program and was introduced into the routine vaccination schedule in endemic and risk areas in 2005, and is currently administered at 9 months of age [9].

The YF vaccine immunogenicity in adults reaches over 95% of vaccinees that may persist for at least 35 years [10]. However, the rates of seroconversion in children ranged from 77.5% to 90%, with distinct seroconversion rates observed according to the age at vaccination [11–17].

The immaturity of the immune system [18–22] and the presence of passively acquired maternal antibody in the serum of the young infant may have an immunosuppressive effect on the development of the infant's own immune response [23–25], and has been presented to account for the decreased humoral immune response of the younger infants.

Despite the extensive literature covering the humoral immune response triggered by the YF vaccines in adults and children, knowledge about the overall cellular immunity following YF immunization still remains to be elucidated, with few studies focusing the multiparametric aspects of the innate and adaptive immunity following YF vaccination [26–33]. Studies performed in primovaccinated adults have demonstrated the coexistence of activation events and modulatory pathways. In addition, a mixed pattern of cytokine profile is also observed as the hallmark of YF-17DD vaccination in adults [31–33]. Regardless of the relevance of the immune response triggered parallel to the establishment of distinct patterns of seroconversion after YF vaccination, there are no studies covering the issue of overall cellular immunity.

The purpose of this study is to evaluate whether the immune response triggered in YF-17DD-vaccinated children resembled the overall pattern previously described in adults and whether the cellular immune response is somehow related to the levels of YF-neutralizing antibodies. To test these hypotheses, we have characterized the impact of YF antigen recall in the intracytoplasmic cytokine pattern of peripheral blood leukocytes and the association between specific cytokine signatures with distinct postvaccination seroconversion status.

METHODS

Study Population

This study was coordinated by the Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine [34] and included 60 healthy children (34 males and 26 females) from 9 to 43 months of age,

living in the metropolitan area of Belo Horizonte-Minas Gerais and Brasília-Distrito Federal, Brazil.

The study was approved by the Ethical Committee of Oswaldo Cruz Foundation FIOCRUZ—protocol number 236A/03. The children were formally included in the study if the free and informed consent form was signed by parents or legal guardians.

Prior to and 30 days after YF-17DD vaccination, children were requested to provide a blood sample to detect anti-YF-neutralizing antibodies using the plaque reduction neutralization test (PRNT), performed as described by Stefano et al. [12]. The tests were carried out at Laboratório de Tecnologia Viroológica, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, under the supervision of one of us (M. S. F.). The results are expressed as milli-International Units/mL (mIU/mL). A PRNT result of $\geq 2.5 \log_{10}$ mIU/mL was used as the cut-off mark to segregate seroconverters from negative and nonseroconverters.

According to the PRNT results at 30 days post vaccination, the children were classified as seroconverters (PRNT $\geq 2.5 \log_{10}$ mIU/mL) or nonseroconverters (PRNT $< 2.5 \log_{10}$ mIU/mL), and referred as PV-PRNT⁺ ($n = 30$, 15 males and 15 females, age range 9–12 months, median = 9 months) and PV-PRNT⁻ ($n = 10$, 6 males and 4 females, age range 12–14 months, median = 12 months), respectively. Children within the PRNT⁺ group were subdivided into 2 groups named PV-PRNT^{MEDIUM+} ($2.5 \leq \text{PRNT} \leq 3.5 \log_{10}$ mIU/mL, $n = 20$) and PV-PRNT^{HIGH+} (PRNT $> 3.5 \log_{10}$ mIU/mL, $n = 10$). The PV-PRNT⁻ volunteers were submitted to revaccination 1 year after primovaccination and referred to as RV-PRNT⁺ ($n = 9$, 6 males and 4 females, age range 40–43 months, median = 41 months) because all volunteers seroconvert after revaccination (PRNT $\geq 2.5 \log_{10}$ mIU/mL).

One year after primo/revaccination, peripheral blood samples (7 mL) were collected into Vacutainer tubes containing sodium heparin (Becton Dickinson, San Jose, CA) for short-term whole blood cultures and intracytoplasmic cytokines analyses by flow cytometry.

Blood samples from 10 unvaccinated seronegative children (PRNT $< 2.5 \log_{10}$ mIU/mL, 7 males and 3 females, age range 9–12 months, median = 9 months) collected prior to vaccination were included as a control group and referred to as UV-PRNT.

Short-term Whole Blood Culture and Intracytoplasmic Cytokine Staining

In vitro short-term cultures of whole blood samples were performed as described by Luiza-Silva et al. [33] and modified as follows: aliquots of heparinized peripheral blood were incubated for 6 hours at 37°C, 5% CO₂, in the presence of RPMI 1640 medium (GIBCO, Grand Island, NY; control culture) or in the presence of live attenuated YF-17DD vaccine (lot 055VFA054P, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ) at a final concentration of 2.5×10^3 viral particles/mL in RPMI 1640

plus (YF-Ag culture). Following in vitro YF-17DD antigen priming, cells were reincubated in the presence of brefeldin A (BFA; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for an additional period of 4 hours at 37°C, 5% CO_2 , and then treated with 2 mM final concentration of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; Sigma Chemical Company) for 10 minutes at room temperature. Cell suspension was washed with fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (phosphate buffered saline [PBS], pH 7.2, supplemented with 0.5% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide, all from Sigma Chemical Company) and aliquots stained with fluorescent antihuman cell surface monoclonal antibodies (all from Caltag, Burlingame, CA): anti-CD4-Tricolor-TC (clone #S3.5), anti-CD8-TC (clone #3B.5), anti-CD14-TC (clone #TüK4), anti-CD16-TC (clone #3G8), and anti-CD19-TC (clone #ST25-C1) for 30 minutes at room temperature. After membrane staining, erythrocyte lysis, and leukocytes fixation, cell suspension was permeabilized with FACS perm-buffer (FACS buffer supplemented with 0.5% saponin) and aliquots incubated for 30 minutes at room temperature, in the dark, with fluorescent anticytokine monoclonal antibodies (all from BD-Pharmingen, San Jose, CA), including anti-IL-12-PE (clone #C11.5), anti-IFN- γ -PE (clone #4S.B3), anti-TNF- α -PE (clone #Mab11), anti-IL-4-PE (clone #8D4-8), anti-IL-5-PE (clone #TRFK5), and anti-IL-10-PE (clone #JES3-19F1). After intracytoplasmic cytokine staining, the leukocytes were washed with FACS perm-buffer and FACS buffer and fixed in FACS fixing solution (10 g/L paraformaldehyde, 10.2 g/L sodium cacodylate, and 6.63 g/L sodium chloride, pH 7.2).

Flow Cytometry Acquisition and Analysis

Immunostained samples were acquired using a FACScalibur flow cytometer, and CELLQuest software was used to perform data acquisition and analysis. A total of 30,000 events/tube were acquired and stored for further analysis. Distinct gating strategies were used to analyze the cytokine-expressing leukocytes subsets, including neutrophils, monocytes, natural killer (NK) cells, and lymphocytes (CD4^+ , CD8^+ T-cell subsets, and B cells) as previously reported by Luiza-Silva et al. [33]. The results were first expressed as percentages of cytokine-positive cells for different gated leukocyte subpopulations analyzed in this study. These values were used to obtain the cytokine index, calculated as the ratio between the percentage of cytokine-positive cells observed in the stimulated culture (YF-Ag) by the percentage of cytokine-positive cells observed in the unstimulated culture (control).

Cytokine Signature Analysis

The cytokine profile was first assessed to identify low and high cytokine producers, as previously suggested by Luiza-Silva et al. [33]. Briefly, after the establishment of the global median YF-Ag/control index, each leukocyte subsets from all volunteers were tagged as they display low (\square), high proinflammatory

(\blacksquare), or high regulatory (\blacksquare) cytokine indexes. The percentage of volunteers showing high cytokine indexes was calculated for each leukocyte subset. The ascendant frequency of high cytokine indexes for PV-PRNT $^+$ was then used as the reference cytokine curves (\rightarrow \square \rightarrow) to identify changes in the overall cytokine patterns from all other groups. Radar charts were further used to summarize the proinflammatory (\blacksquare) or regulatory (\blacksquare) cytokine signatures in a range of leukocyte subsets of innate and adaptive immunity. Each axis represents the frequency (%) of volunteers showing high cytokine indexes.

Statistical Analysis

Statistical analyses between groups were performed by parametric analysis of variation (ANOVA) followed by Student *t* test or nonparametric Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney test. Spearman rank correlation test was performed to assess the association between the levels of PRNT antibodies (\log_{10} mIU/mL) and the cytokine indexes (YF-Ag/control). In all cases, significance was considered at $P \leq .05$. All tests were provided by GraphPad Prism version 5.0 (San Diego, CA).

The analysis of cytokine signatures was performed using the PV-PRNT $^+$ cytokine signature as the reference curve, and significant differences were considered when the values emerged outside the quartile of the reference signature.

RESULTS

Impact of In Vitro YF-Vaccinal Antigen Stimuli on the Cytokine Profile of Innate and Adaptive Immunity in YF-17DD Primovaccinated Children

The frequency of cytokine $^+$ cells (IL-12 $^+$, IFN- γ $^+$, TNF- α $^+$, IL-4 $^+$, IL-5 $^+$, and IL-10 $^+$), focusing on circulating neutrophils, monocytes, NK cells, CD4^+ T cells, CD8^+ T cells, and B cells, was determined after short-term in vitro incubation of whole blood samples. Our data demonstrated that the YF-Ag recall was able to increase the synthesis of IL-12 by neutrophils in PV-PRNT $^+$ compared with PV-PRNT $^-$ and UV-PRNT $^-$, as well as IL-12 by monocytes compared with PV-PRNT $^-$. In addition, whereas the YF-Ag recall decreased the synthesis of TNF- α by neutrophils and monocytes in PV-PRNT $^-$, the levels of TNF- α in PV-PRNT $^+$ was higher and comparable to that observed in UV-PRNT $^-$ (Figure 1). Furthermore, the YF-Ag recall decreased the synthesis of IL-4 by CD4^+ T cells in PV-PRNT $^+$ compared with UV-PRNT $^-$ (Figure 2). Together, these findings demonstrated that the seroconversion after YF-17DD primovaccination in children is able to guarantee, upon YF-Ag recall, the establishment of a proinflammatory microenvironment via enhanced synthesis of IL-12 and TNF- α by neutrophils and monocytes and down-regulated the production of IL-4 by CD4^+ T cells.

Conversely, the lack of seroconversion after YF-17DD primovaccination promote a regulatory status upon YF-Ag recall, with lower production of IL-12 by neutrophils and monocytes

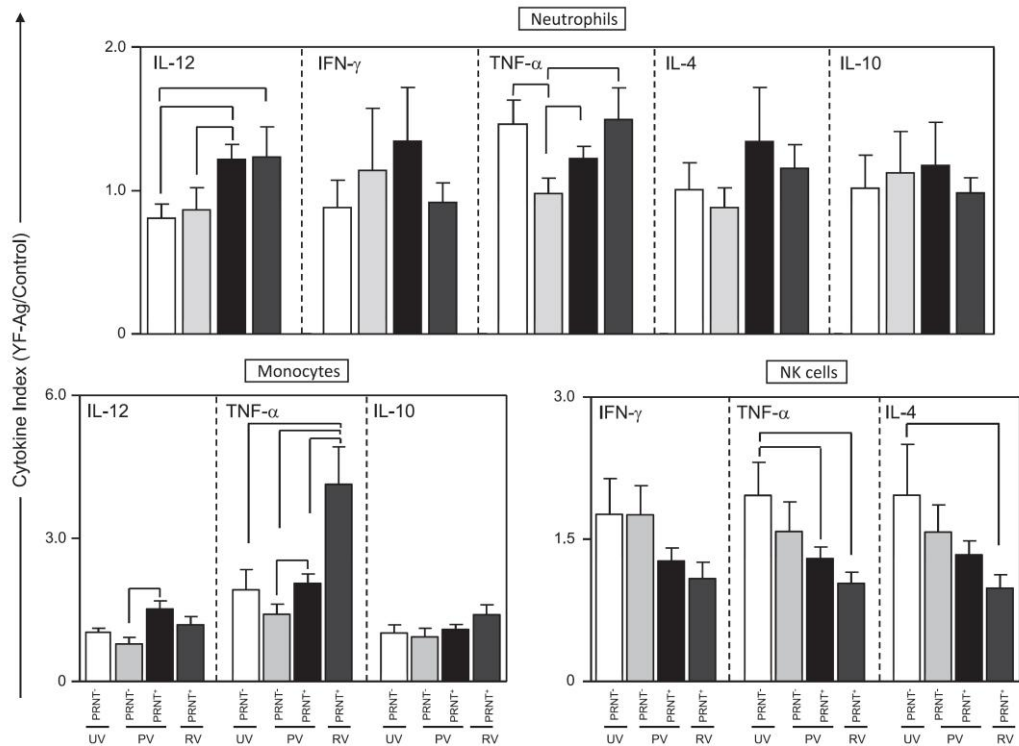


Figure 1. Impact of YF-Ag in the cytokine profile of innate immune cells from UV-PRNT⁻ (in white), PV-PRNT⁻ (in light gray), PV-PRNT⁺ (in black), and RV-PRNT⁺ (in dark gray) children groups 1 year after YF-17DD vaccination or revaccination. Intracytoplasmic cytokine studies were performed after in vitro short-term incubation. To identify neutrophils (top panels) and NK cells (bottom panels), anti-CD16 TC mAbs were used, and to identify monocytes (middle panels) CD14 TC mAbs were used. Anti-cytokines-PE mAbs were used to determine inflammatory and regulatory cytokines⁺ of innate immunity leukocytes in peripheral blood samples. The index ratio was calculated as the ratio of percentage of cells that express the cytokine of interest in the stimulated culture (YF-Ag) to the percentage of cytokine⁺ cells in the unstimulated (control) culture. Results are expressed in bars representing mean values \pm SEM. Significant differences (connecting lines) at $P < .05$ are shown on the figure.

compared with PV-PRNT⁺, and lower synthesis of TNF- α by neutrophils compared with all other groups and TNF- α by monocytes compared with PRNT⁺ groups (Figure 1). Moreover, the PV-PRNT⁻ also displayed enhanced synthesis of IL-5 by CD8⁺ T cells compared with UV-PRNT⁻, and IL-10 by CD8⁺ T cells compared with all other groups (Figure 2).

It was interesting to notice that the revaccination accompanied by protective levels of neutralizing antibodies modify the cytokine response of innate immunity toward increased synthesis of IL-12 and TNF- α by neutrophils compared with UV-PRNT⁻ and PV-PRNT⁻, respectively (Figure 1). Moreover, a marked increase in the synthesis of TNF- α by monocytes was also observed in RV-PRNT⁺ compared with all other groups. A general inhibition of cytokine synthesis by NK cells (IFN- γ , TNF- α , and IL-4) was observed in RV-PRNT⁺ (Figure 1). Additionally, in response to YF-Ag recall, the RV-PRNT⁺ also displayed a putative

proinflammatory pattern in the adaptive immunity, with increased production of TNF- α by B cells and lower production of IL-4 by CD4⁺ T cells compared with UV-PRNT⁻, along with basal synthesis of IL-10 by CD8⁺ T cells (Figure 2). Together, it seems that the revaccination of YF-17DD nonseroconverter shifted the microenvironment triggered by the YF-Ag recall toward a proinflammatory profile, with higher synthesis of TNF- α by neutrophils, monocytes, and B cells along with lower production of IL-4 by CD4⁺ T cells and IL-10 by CD8⁺ T cells, despite the overall inhibition of cytokine synthesis by NK cells.

Overall Signature of High Cytokine Producers in the Innate and Adaptive Immune Compartments Triggered by YF-Ag Recall in 17DD Vaccinees

Aiming to further characterize the overall cytokine signature of innate and adaptive immunity compartments, we have calculated

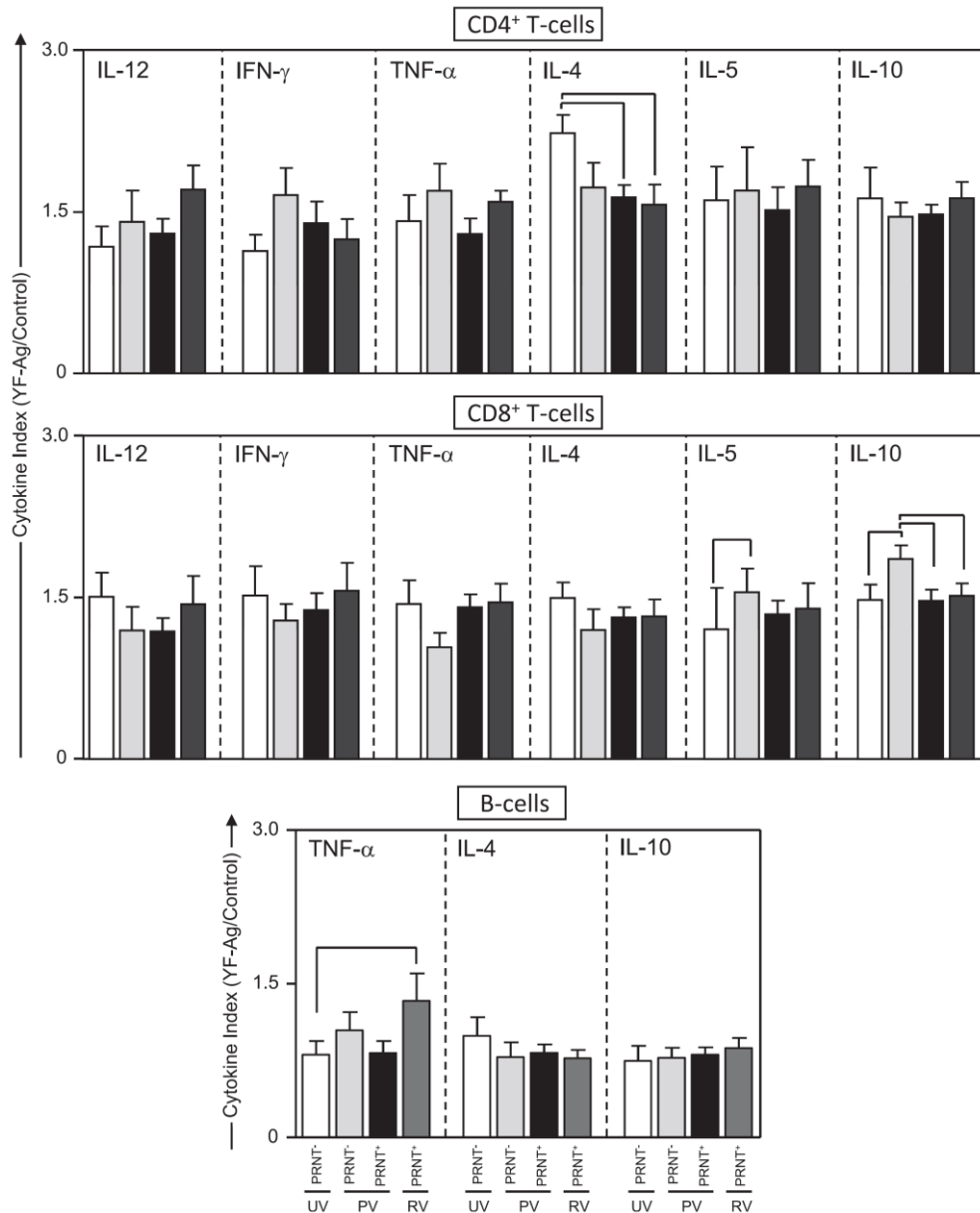


Figure 2. Impact of YF-Ag in the cytokine profile of adaptive immune cells from UV-PRNT⁻ (in white), PV-PRNT⁻ (in light gray), PV-PRNT⁺ (in black), and RV-PRNT⁺ (in dark gray) children groups 1 year after YF-17DD vaccination or revaccination. Intracytoplasmic cytokine studies were performed after in vitro short-term incubation. To identify CD4⁺ T cells (top panels), CD8⁺ T cells (middle panels), and B cells (bottom panels), anti-CD4 TC, anti-CD8 TC, and anti-CD19 FITC mAbs were used, respectively. Anticytokines PE mAbs were used to determine proinflammatory and regulatory cytokines⁺ of adaptive immunity leukocytes in peripheral blood samples. The index ratio was calculated as the ratio of the percentage of cells that express the cytokine of interest in the stimulated culture (YF-Ag) to the percentage of cytokine⁺ cells in the unstimulated (control) culture. The results are expressed in bars representing mean values \pm SEM. Significant differences (connecting lines) at $P < .05$ are shown.

Analysis of Innate/Adaptive High Cytokine Indexes

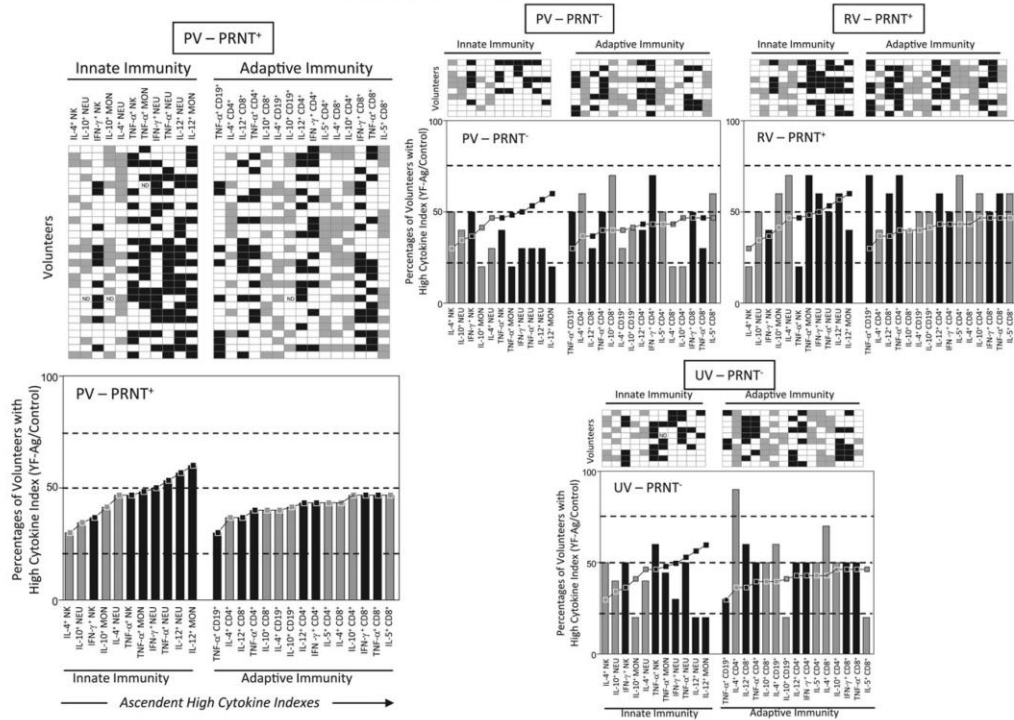


Figure 3. Overall signature of high cytokine producers in the innate and adaptive immune compartments triggered by in vitro YF-Ag stimulation. The diagrams were plotted using the global median cytokine index (YF-Ag/control) as the cut-off mark to identify each volunteer as a low (□) or high (■) cytokine producer in the PV-PRNT⁺, PV-PRNT⁻, RV-PRNT⁺, and UV-PRNT⁻ groups. The ascendant frequency of high cytokine producers at the innate and adaptive immunity of each group was demonstrated by bar graphics. The ascendant frequency of high cytokine producers of the PV-PRNT⁺ group was used to generate the reference cytokine signature curves (—■—■—) that were applied to identify changes in the overall cytokine signature from all other groups.

the global median cytokine index (YF-Ag/control) for each cell population (IL-12⁺NEU = 0.9; IFN-γ⁺NEU = 0.8; TNF-α⁺NEU = 1.1; IL-4⁺NEU = 0.9, IL-10⁺NEU = 0.9; IL-12⁺MON = 1.1; TNF-α⁺MON = 1.8; IL-10⁺MON = 1.0; IFN-γ⁺NK = 1.2; TNF-α⁺NK = 1.3; IL-4⁺NK = 1.3; IL-12⁺CD4⁺ = 1.2; IFN-γ⁺CD4⁺ = 1.1; TNF-α⁺CD4⁺ = 1.4; IL-4⁺CD4⁺ = 1.6; IL-5⁺CD4⁺ = 1.3; IL-10⁺CD4⁺ = 1.4; IL-12⁺CD8⁺ = 1.1; IFN-γ⁺CD8⁺ = 1.2; TNF-α⁺CD8⁺ = 1.2; IL-4⁺CD8⁺ = 1.3; IL-5⁺CD8⁺ = 1.2; IL-10⁺CD8⁺ = 1.5; TNF-α⁺CD19⁺ = 0.8; IL-4⁺CD19⁺ = 0.8; IL-10⁺CD19⁺ = 0.8; where NEU = neutrophil, MON = monocyte, and NK = natural killer) and used these values as the cut-off mark to tag the cell population from each volunteer as being a low (□) or high (■) cytokine producer. The assembling of the ascendant frequency of high cytokine producers at the innate and adaptive immunity of PV-PRNT⁺ vaccinees generated the reference cytokine signature curves (—■—■—) applied to identify changes in the overall

cytokine signature from all other groups (PV-PRNT⁻, RV-PRNT⁺, and UV-PRNT⁻). Our findings demonstrated that the cytokine signature curves triggered by the YF-Ag recall in PV-PRNT⁺ was characterized by a prominent involvement of innate immunity (mainly represented by NEU and MON) along with an uniform participation of the adaptive immunity cells (T-cell subsets and B lymphocytes) (Figure 3).

The comparative analysis of the cytokine signature, taking the PV-PRNT⁺ as reference curves, demonstrated that the PV-PRNT⁻, likewise the UV-PRNT⁻, presented an impaired involvement of innate immunity cells upon YF-Ag recall (specially represented by NEU and MON) with punctual enhancement in the adaptive immunity cells (especially CD4⁺ and CD8⁺ T cells) (Figure 3). Interestingly, the RV-PRNT⁺ group are able to almost overturn the deficient involvement of the innate immunity, restoring almost all the cytokine profile of NEU and MON, leading to even over-frequency of high cytokine producers in

the innate and adaptive immunity, despite the overall impairment of NK cells (Figure 3).

Overall Pattern of Proinflammatory and Regulatory High Cytokine Producers Triggered by YF-Ag Recall in 17DD Vaccinees

In order to further characterize the overall cytokine pattern of YF-17DD-vaccinated children, we have constructed radar charts to characterize the frequency of high proinflammatory and regulatory cytokine producers in the PV-PRNT⁺ group (Figure 4, top chart) to be used as a standard to identify changes in the overall cytokine pattern in PV-PRNT⁻, RV-PRNT⁺, and UV-PRNT⁻ (Figure 4, middle and bottom charts).

Our data demonstrate that the overall cytokine pattern of the PV-PRNT⁺ group was characterized by a prominent participation of the proinflammatory compartment of the innate immune response (especially driven by IL-12⁺ and TNF- α ⁺ NEU and MON along IFN- γ ⁺ NEU). This profile was counterbalanced by a uniform microenvironment of regulatory cytokine (driven by uniform synthesis of IL-4, IL-5, and IL-10 from CD4⁺ and CD8⁺ T cells) (Figure 4, top chart).

The comparative analysis of the overall cytokine pattern observed in PV-PRNT⁻ demonstrated a relevant deficiency in the synthesis of proinflammatory cytokines at innate immunity (mainly IL-12⁺ and TNF- α ⁺ NEU and MON) along with punctual enhancement of regulatory cytokines (especially IL-4 from NK and CD4⁺ T cells along with IL-10 and IL-5 from CD8⁺ T cells) (Figure 4, middle left chart).

Interestingly, the RV-PRNT⁺ was able to overturn the impaired involvement of proinflammatory cytokines and restore regulatory profile, leading to an over-frequency of high cytokine producers (Figure 4, middle right chart).

The cytokine pattern of UV-PRNT⁻ somehow resembles the profile observed for the PV-PRNT group (Figure 4, bottom chart).

Association Between the Serum Levels of Anti-YF-Neutralizing Antibodies After 17DD Primovaccination and the Overall Signature of High Cytokine Producers Triggered by YF-Ag Recall

Based on the serum levels of anti-YF-neutralizing antibodies, the 17DD primovaccinees were categorized into 3 distinct subgroups, referred to as PRNT⁻, PRNT^{MEDIUM+}, and PRNT^{HIGH+}. Using this criterion, our data demonstrated that all UV-PRNT⁻ and PV-PRNT⁻ were confined to a level below the cut-off mark (<2.5 log₁₀ mUI/mL). The PV-PRNT⁺ and RV-PRNT⁺ groups presented levels of neutralizing antibodies above the cut-off mark (\geq 2.5 log₁₀ mUI/mL). The PV-PRNT⁺ group presented distinct patterns of neutralizing antibodies, including MEDIUM (2.5–3.5 log₁₀ mUI/mL) or HIGH (>3.5 log₁₀ mUI/mL) (Figure 5, top panel). Our findings demonstrated that PV-PRNT^{MEDIUM+} presented an overall balanced cytokine signature confined to the second quartile. It was interesting to notice that the polarization of humoral immune response toward PRNT⁻ or PRNT^{HIGH+}

was associated with dichotomic cytokine signatures. While the PV-PRNT⁻ presented a cytokine profile with a slight increase in the regulatory pattern on the adaptive immunity (IL-4⁺ CD4⁺ T cells along with IL-5⁺ and IL-10⁺ CD8⁺ T cells), the PV-PRNT^{HIGH+} displayed a cytokine signature associated with an enhanced proinflammatory profile, mainly in the innate immunity compartment (IL-12⁺ NEU and MON along with IFN- γ ⁺ NEU) (Figure 5, middle panel). Additional correlation analyses validate these findings, demonstrating a positive correlation between the inflammatory response of innate immunity (IL-12⁺ NEU and MON along with IFN- γ ⁺ NEU) and the levels of PRNT antibodies as well as TNF- α ⁺ CD8⁺ T cells. On the other hand, negative correlation indexes were observed between IL-4⁺ CD4⁺ and IL-10⁺ CD8⁺ T cells (Figure 5, bottom panels).

Taken together, our results demonstrated in YF-17DD primovaccinees that the overall signature of high cytokine producers triggered by YF-Ag recall is associated with the levels of anti-YF-neutralizing antibodies, with a balanced proinflammatory and regulatory profile of innate and adaptive immunity being the hallmark of PV-PRNT^{MEDIUM+}, whereas a polarized regulatory signature is observed in PV-PRNT⁻ and a prominent proinflammatory signature is characteristic of PV-PRNT^{HIGH+}.

DISCUSSION

The purpose of our study is to evaluate immune responses in infants vaccinated at 9 months of age with YF-17DD vaccine through detailed investigation of the in vitro YF antigens impact in the intracytoplasmic cytokine pattern of peripheral innate and adaptive leukocytes, aiming to characterize the cytokines profile involved with status vaccination.

Little is known about the immune response in children following YF vaccination. Previous reports have postulated that infants have deficiencies in primary antigen presentation by dendritic cells, limited T-cell proliferation, impaired B-cell function, and reduced production of cytokines by helper T cells of the type 1 subset (TH1), including interleukin 2 (IL-2) and interferon gamma (IFN- γ) [35–41]. In the present investigation, our data demonstrated that the impact of in vitro YF-vaccinal antigen stimuli on the cytokine profile of innate and adaptive immunity in YF-17DD primovaccinated children promoted distinct immunological profiles characterized by a balanced involvement of proinflammatory/regulatory adaptive immunity with a prominent participation of the innate immunity proinflammatory events in the PV-PRNT⁺ group mediated by IL-12⁺ and TNF- α ⁺ NEU and MON, along with down-regulation of IL-4⁺ CD4⁺ T cells. Conversely, the absence of seroconversion in the PV-PRNT⁻ children was accompanied by a regulatory status with lower index of IL-12⁺ and TNF- α ⁺ NEU and MON, along with up-regulation of IL-5⁺ and IL-10⁺ CD8⁺ T cells. Moreover, the analysis of the cytokine signature confirmed that these subjects presented a striking lack of proinflammatory response

Overall Pattern of Inflammatory/Regulatory High Cytokine Indexes

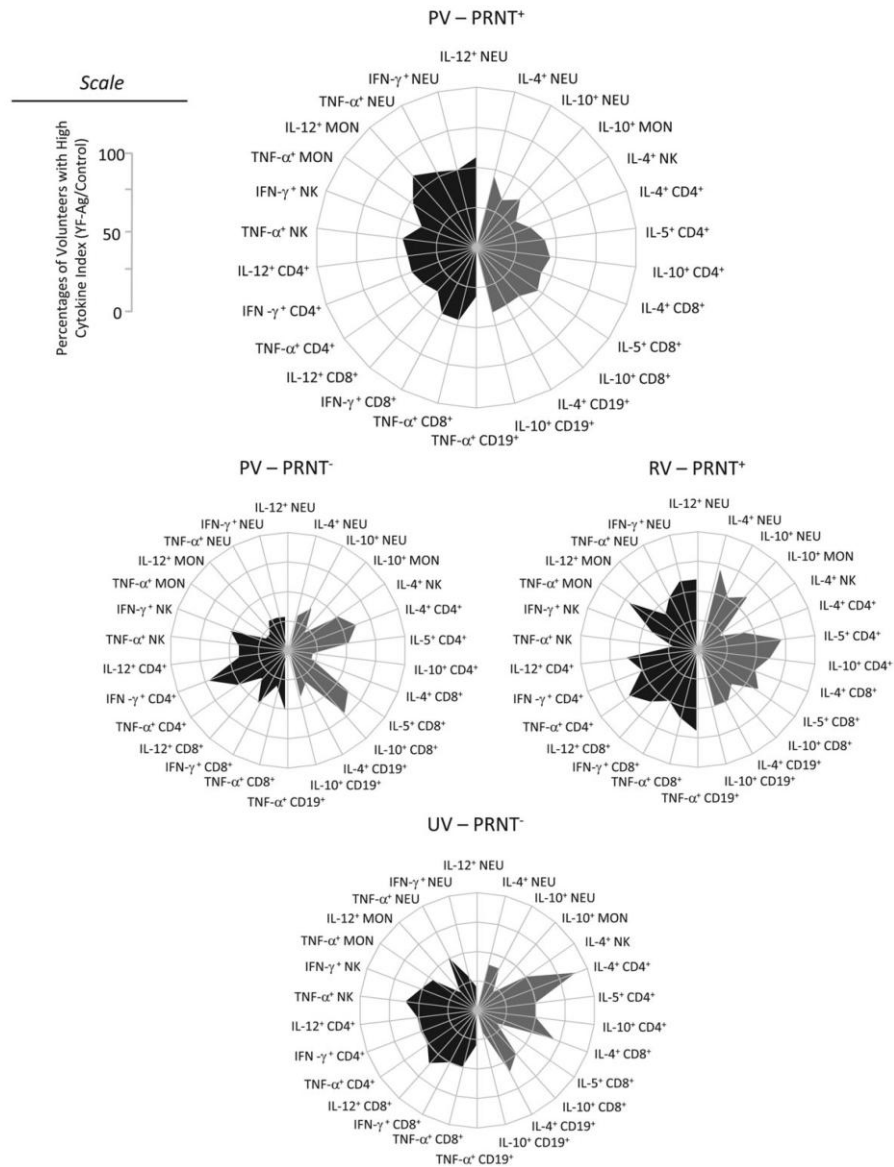


Figure 4. Overall pattern of proinflammatory and regulatory high cytokine producers triggered by YF-Ag recall in 17DD vaccines. Radar chart summarizes the cytokine signatures the proinflammatory (■) or regulatory (□) cytokine balance in a range of cell subsets of innate and adaptive immunity from the PV-PRNT⁺, PV-PRNT⁻, RV-PRNT⁺, and UV-PRNT⁻ groups. Each axis displays the proportion of each cytokine balance category within a given leukocyte subset.

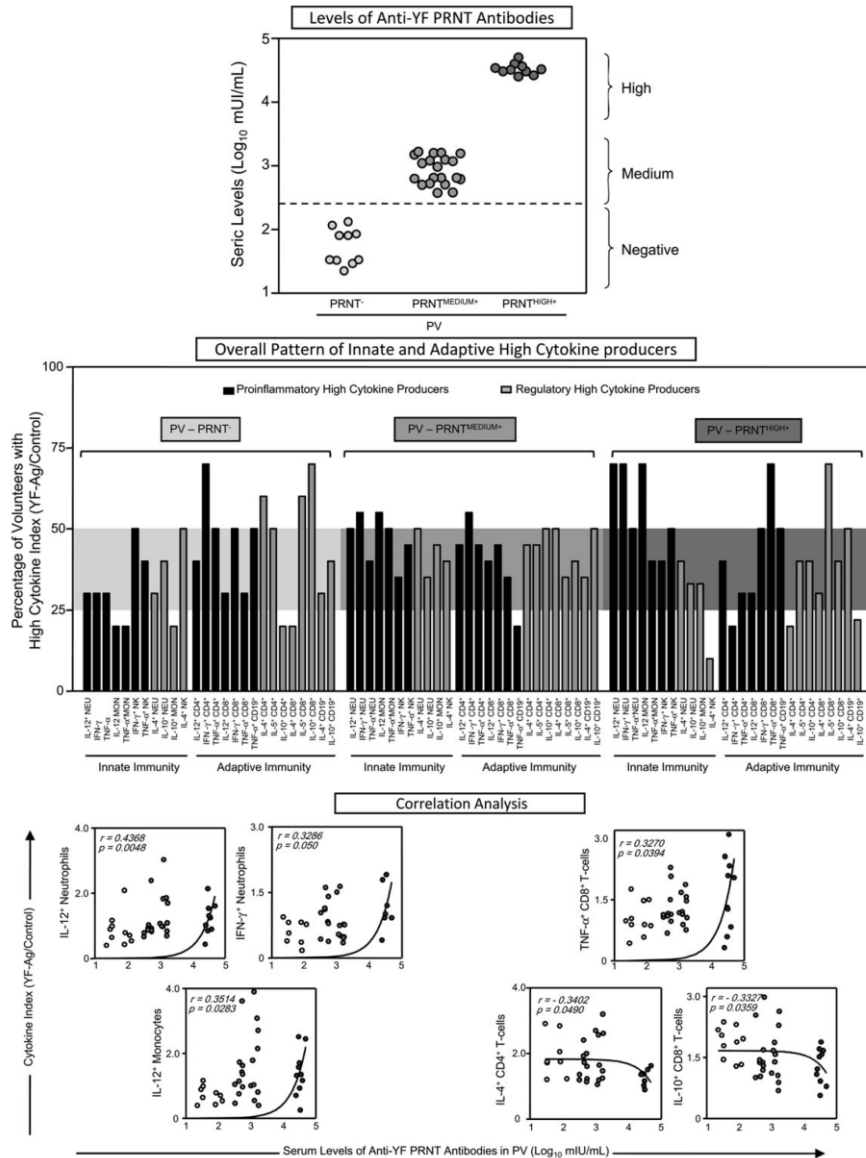


Figure 5. Association between the serum levels of anti-YF-neutralizing antibodies after 17DD vaccination and the overall signature of high cytokine producers triggered by YF-Ag recall. Top panel represents the categorization of study group according to the serum levels of anti-YF-neutralizing antibodies of 17DD after primo/revaccination in PV-PRNT⁻, PV-PRNT^{MEDIUM+}, and PV-PRNT^{HIGH+}. Middle panel displays the association between the overall signature of high cytokine producers and the serum levels of anti-YF-neutralizing antibodies in PV-PRNT⁻, PV-PRNT^{MEDIUM+}, and PV-PRNT^{HIGH+} groups; bottom panels demonstrates the positive correlation between IL-12⁺ neutrophils and monocytes, and IFN- γ ⁺ neutrophils and the levels of PRNT antibodies (bottom left panels). Bottom right panels display negative correlation of IL-4⁺ CD4⁺ T cells, as well as the positive correlation of TNF- α ⁺ and negative correlation of IL-10⁺ in CD8⁺ T cells and the levels of PRNT antibodies. The data are expressed as scattering of all individual values (UV; PRNT⁻; and low, moderate, and high PRNT⁺ groups) and include the frequency of cytokines⁺ cells and the levels of PRNT antibodies (mIU/mL). Correlation indexes (*r* and *P* values) are provided in the figure.

in the innate immunity compartment besides an overall increased adaptive regulatory profile. This resultant regulatory profile observed in PV-PRNT⁻ children, similar to that observed in unvaccinated children (UV-PRNT⁻), suggests a putative vulnerability of these subjects to develop a risky immune response upon contact with the wild-type YF virus, favoring viral replication, especially due to the lack of proinflammatory pathways in the innate immunity.

Interestingly, when the PV-PRNT⁻ children were revaccinated, all volunteers seroconverted and the overall regulatory cytokine signature were shifted toward a proinflammatory status, similar to that observed in the seroconverter group (PV-PRNT⁺), especially mediated by TNF- α ⁺NEU, MON, and B cells, along with lower levels of IL-4⁺CD4⁺ and IL-10⁺CD8⁺ T cells. These data demonstrated that along with the seroconversion event, the 17DD-YF vaccine booster was able to restore almost all immunological events observed in the ideal reference cytokine signature characterized by a balanced involvement of proinflammatory/regulatory immunity. The presence of neutralizing antibodies along with the pro-inflammatory/regulatory cytokine signature observed in the re-vaccinated children may represent a relevant biomarker of protective immunity upon the contact with the YF wild virus. This shift in the immunological status suggests that revaccination could be helpful to guarantee the seroconversion besides a protective cellular immune response, especially in endemic areas where vaccination is the primary way to prevent infection and children are constantly exposed to wild YF virus.

Our data demonstrated that the overall cytokine signature observed in the PV-PRNT⁺ group was somehow associated with the levels of PRNT antibodies, with a predominant proinflammatory pattern observed in those individuals that displayed a higher PRNT profile. These finding may suggest that higher levels of PRNT antibodies may be a good biomarker, and may be associated with a prominent antiviral immune response.

It is important to note that this study focused mainly on the interface of the humoral and cellular immune response with regard to major consequences that distinct patterns of seroconversion may have in the overall cytokine signatures—biomarkers of the cellular immune response. However, our investigation did not accomplish an important issue regarding the YF-17DD vaccination in children—the mechanisms underlying the establishment of distinct status of seroconversion observed in YF vaccinees [11–17]. Several proposals have been presented to explain this phenomenon, including the vaccine substrain (17D-204, 17D-213/77, or 17DD), the presence of residual maternal antibodies, the baseline cytokine signature at the individual level, and the interference of simultaneous viral vaccination [18–25]. The Collaborative Group for the Study of Yellow Fever Vaccines has already reported in an observational multicenter study [17] that the age at primovaccination is a relevant variable that would contribute to the seroconversion rate.

In that investigation, the 17DD-YF vaccine reached higher seroconversion rates among children older than 2 years: 97% among children >10 years and 94% among children 2–9 years old; data showed lower seroconversion rates in children <2 years: 88% for 12–23-month-olds, 72% for 9–11-month-olds, and 82% for 6–8-month-olds. In the present study, the age was not related to the lack of seroconversion after YF-17DD, since the mean age in the PV-PRNT⁻ was even higher in comparison with the PV-PRNT⁺. Complementary kinetic studies early after YF-vaccination are still required to elucidate the mechanism responsible for the distinct profile of seroconversion.

Funding

This research was supported by Bio-Manguinhos/Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ; grant 05/05, 05/08, and CC#009/2010), Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant #479663/2004-1, grant #308651/2006-5, grant #472782/2009-6, and PQ# 303316/2009-8), and the Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG; grant# APQ 01183-08, APQ 01877-10, and PDJ 00265-09).

Acknowledgments

We thank Dr Ivone Perez de Castro from the Secretaria de Saúde do Distrito Federal for coordinating the fieldwork in Brasília, DF, Brazil, and Rosângela Aparecida de Azevedo for the logistical support during fieldwork in Minas Gerais, Brazil; the Program for Technological Development of Health Products (PDTIS) for technological development in tools for health; and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) for use of its facilities. E. G. K., A. T. C., and O. A. M. F. thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for fellowships PQ. A. C. C. A. acknowledges the Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG) for the fellowship PDJ 00265/09.

References

1. Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *J Exp Med* **1937**; 65:787–800.
2. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* **2004**; 4:11–20.
3. Silveira-Lemos D, Martins MA, Silva ML, Homma A, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO. Insights on yellow fever immune response following natural infection and vaccination. *Curr Trends Immunol* **2008**; 9:1–14.
4. World Health Organization. Global programme for vaccines and immunization. Expanded programme on immunization. Yellow fever. Geneva: World Health Organization, **1998**; 1–87. <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/ww9842.pdf>. Accessed 06 May 2010.
5. Yellow fever vaccine recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* **2010**; 59.
6. Barrett AD, Niedrig M, Teuwen DE. International laboratory network for yellow fever vaccine-associated adverse events. *Vaccine* **2008**; 26: 5441–2.
7. World Health Organization. Technical consensus meeting of yellow fever. Geneva: World Health Organization, **1998**; 2–3. http://www.who.int/immunization_monitoring/resources/YF_consensus_meeting_98.pdf. Accessed 06 May 2010.
8. Monath TP. Yellow fever. In: Plotkin SA, Orenstein WA eds. *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, **1999**; 815–79.
9. Ministério da Saúde do Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Manual de Procedimentos para Vacinação. 4ª Ed. Brasília, DF: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde/Ascom/Pre/FUNASA, **2001**. http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_normas_vac.pdf. Accessed 06 May 2010.

10. Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30–35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ* **1981**; 59:895–900.
11. Meyer HM Jr, Hostetler DD Jr, Bernhein BC, et al. Response of Volta children to jet inoculation of combined live measles, smallpox and yellow fever vaccines. *Bull World Health Organ* **1964**; 30:783–94.
12. Stefano I, Sato HK, Pannuti CS, et al. Recent immunization against measles does not interfere with the seroresponse to yellow fever vaccine. *Vaccine* **1999**; 17:1042–6.
13. Robertson S. The immunological basis for immunization series: yellow fever. Geneva: World Health Organization, 1993. http://www.who.int/immunization/documents/WHO_EPI_GEN_93.18/en/index.html. Accessed 06 May 2010.
14. Georges AJ, Tibbe F, Meunier DM, et al. Thermostability and efficacy in the field of a new, stabilized yellow fever virus vaccine. *Vaccine* **1985**; 3:313–5.
15. Lhuillier M, Mazzariol MJ, Zadi S, et al. Study of combined vaccination against yellow fever and measles in infants from six to nine months. *J Biol Stand* **1989**; 17:9–15.
16. Mouchon D, Pignon D, Vicens R, et al. The combined measles–yellow fever vaccination in African infants aged 6 to 10 months. *Bull Soc Path Exot* **1990**; 83:537–51.
17. Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o Estudo da Soroconversão pela Vacina contra Febre Amarela. Estudo multicêntrico de soroconversão pela vacina contra febre amarela. *Ciência Saúde Coletiva* **2003**; 8(Suppl 2):511–1.
18. Harris DT, Schumacher MJ, Locascio J, et al. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**; 89:10006–10.
19. Durandy A, De Saint Basile G, Lisowska-Groszpiere B, et al. Undetectable CD40 ligand expression on T cells and low B cell responses to CD40 binding agonists in human newborns. *J Immunol* **1995**; 154:1560–8.
20. Marchant A, Newport M. Prevention of infectious diseases by neonatal and early infantile immunization: prospects for the new millennium. *Curr Opin Infect Dis* **2000**; 13:241–6.
21. Siegrist CA. Neonatal and early life vaccinology. *Vaccine* **2001**; 19:3331–46.
22. Upham JW, Rate A, Rowe J, Kusel M, Sly PD, Holt PG. Dendritic cell immaturity during infancy restricts the capacity to express vaccine-specific T cell memory. *Infect Immun* **2006**; 74:1106–2.
23. Murphy BR, Alling DW, Snyder MH, et al. Effect of age and preexisting antibody on serum antibody. *J Clin Microbiol* **1986**; 24:894–8.
24. Glezen WP. Effect of maternal antibodies on the infant immune response. *Vaccine* **2003**; 21:3389–92.
25. Suzano CE, Amaral E, Sato HK, Papaioordanou PM. Campinas Group on Yellow Fever Immunization during Pregnancy. The effects of yellow fever immunization (17DD) inadvertently used in early pregnancy during a mass campaign in Brazil. *Vaccine* **2006**; 24:1421–6.
26. Sullender WM, Miller JL, Yasukawa LL, et al. Humoral and cell-mediated immunity in neonates with herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* **1987**; 155:28–37.
27. Pass RF, Dworsky ME, Whitley RJ, August AM, Stagno S, Alford CA Jr. Specific lymphocyte blastogenic responses in children with cytomegalovirus and herpes simplex virus infections acquired early in infancy. *Infect Immun* **1981**; 34:166–70.
28. Hayward AR, Herberger MJ, Groothuis J, Levin MR. Specific immunity after congenital or neonatal infection with cytomegalovirus or herpes simplex virus. *J Immunol* **1984**; 133:2469–73.
29. Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'age-Stehr J. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *J Med Virol* **1998**; 56:159–67.
30. Hacker UT, Jelinek T, Erhardt S, et al. In vivo synthesis of tumor necrosis factor-alpha in healthy humans after live yellow fever vaccination. *J Infect Dis* **1998**; 177:774–8.
31. Martins MA, Silva ML, Marciano AP, 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? *Clin Exp Immunol* **2007**; 148:90–100.
32. Martins MA, Silva ML, Elói-Santos SM, et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine* **2008**; 26:1173–84.
33. Silva ML, Martins MA, Espírito-Santo LR, et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine* **2011**; 29:583–92.
34. Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: implications for the Brazilian National Immunization. *Vaccine* **2007**; 25:3118–23.
35. Burchett SK, Corey L, Mohan KM, Westall J, Ashley R, Wilson CB. Diminished interferon gamma and lymphocyte proliferation in neonatal and postpartum primary herpes simplex virus infection. *J Infect Dis* **1992**; 165:813–8.
36. Hunt DW, Huppertz HI, Jiang HJ, Petty RE. Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood* **1994**; 84:4333–43.
37. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* **1994**; 180:1263–72.
38. Brugnani D, Airò P, Graf D, et al. Ineffective expression of CD40 ligand on cord blood T cells may contribute to poor immunoglobulin production in the newborn. *Eur J Immunol* **1994**; 24:1919–24.
39. Nonoyama S, Penix LA, Edwards CP, et al. Diminished expression of CD40 ligand by activated neonatal T cells. *J Clin Invest* **1995**; 95:66–75.
40. van Essen D, Kikutani H, Gray D. CD40 ligand transduced costimulation of T cells in the development of helper function. *Nature* **1995**; 378:620–3.
41. Wedgwood JF, Palmer R, Weinberger B. Development of the ability to make IgG and IgA in newborns and infants. *Mt Sinai J Med* **1994**; 61:409–15.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um perfil reemergente da febre amarela vem sendo observado principalmente a partir dos anos de 1990, simultaneamente com o aumento na dispersão do *Ae aegypti* e epidemias de dengue, o que aumenta o risco de reurbanização da doença. A imunização de indivíduos residentes em áreas endêmicas ou ameaçadas, bem como de turistas, alvos de infecção e vetores potenciais da febre amarela em seu retorno para áreas susceptíveis é uma recomendação da Organização Mundial da Saúde. Em adição, o Programa Nacional de Imunizações, do Ministério da Saúde do Brasil, introduziu a vacina no calendário de vacinação infantil na última década. Nos últimos anos, a reemergência da febre amarela, em regiões onde a doença não era registrada há décadas, levou os órgãos de saúde pública do Brasil a realizarem extensas campanhas de vacinação. Com o aumento do uso da vacina, o Sistema de Informações de Vigilância de Eventos Adversos Pós-vacinais (SI-EAPV) registrou um aumento de eventos adversos graves associados à vacinação.

Apesar de sua ampla utilização no Brasil e no mundo e do seu grande sucesso, a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares, envolvidos na geração da resposta imune efetiva, bem como os fatores envolvidos no desencadeamento de eventos adversos graves induzidos pela vacina contra febre amarela não são claros e precisam ser ainda completamente esclarecidos. Embora a vacina esteja em uso há mais de 70 anos, somente mais recentemente tem-se observado um aumento de os estudos relacionados à resposta imune celular à vacina antiamarílica. As novas descobertas sobre a interação da vacina 17D com o sistema imune inato ampliou conhecimento sobre o funcionamento da mesma, mas as consequências destas interações na extensão e qualidade da resposta imune adaptativa ainda estão sendo investigadas. Apesar da relevância dos estudos pós-vacinação antiamarílica 17D, poucos dados na literatura abordam o perfil imunológico antiamarílico de pacientes que receberam a vacina antiamarílica 17DD.

Estudos prévios realizados por nosso grupo, considerando a imunofenotipagem de leucócitos circulantes de adultos primovacinados, demonstraram que a imunidade contra a febre amarela, induzida pela vacina antiamarílica 17DD, é caracterizada por uma resposta imune do tipo mista, com o estabelecimento simultâneo de eventos de ativação e regulação, envolvendo tanto

células da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa, não havendo polarização de perfis de resposta imune no período pós-vacinal. O estabelecimento de um padrão de síntese de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, de caráter misto, com predomínio de eventos pró-inflamatórios restrito ao sétimo dia após a primovacinação também foi observado. Esses estudos permitiram a elaboração de uma hipótese que a imunização antiamarílica efetiva e segura requer o desencadeamento de mecanismos balanceados inflamatórios e reguladores no âmbito da imunidade inata e adaptativa.

Neste contexto, considerando a necessidade de se ampliar a compreensão dos fenômenos imunológicos relacionados à vacina contra a febre amarela, este projeto se propôs a avaliar o panorama da resposta imune vacinal após estimulação *in vitro* com antígenos vacinais, por entender que esta estratégia de análise ofereceria evidências adicionais sobre os eventos imunológicos pós-vacinação envolvidos na imunidade antiamarílica, proporcionando uma melhor compreensão da resposta imune celular ao vírus e contribuindo para estudos futuros acerca da proteção desencadeada por vacinas.

No estudo abordado, no artigo 1, a cinética da resposta de citocinas intracitoplasmáticas e o impacto do antígeno amarílico 17DD no panorama de citocinas de leucócitos circulantes foram ser descritos em adultos primovacinados. A análise panorâmica dos dados da resposta imune vacinal, utilizando uma nova estratégia proposta por Vitelli-Avelar e colaboradores (2008), a partir do conceito de baixa e alta produção de citocinas, permitiu avaliar de forma mais ampla e completa o perfil dominante de citocinas produzidas por populações e subpopulações de leucócitos circulantes, tanto individualmente quanto no âmbito da cinética da síntese de citocinas. Os dados demonstraram, na ausência de estímulo antígeno-específica, um perfil de citocinas misto no dia 0, pró-inflamatórias no 7º dia devido principalmente às células do sistema imune inato (neutrófilos e monócitos), seguido de perfil misto de citocinas nos dias 15 e 30. Após estimulação antígeno-específica *in vitro*, foi observado um perfil misto/regulador de citocinas nos dias 0 e 7, seguido de perfil misto nos dias 15 e 30. Sob impacto da vacinação 17DD alterações foram observadas no perfil de citocinas após estimulação *in vitro*, principalmente, antes da soroconversão (dias 0 e 7) e menores alterações após a soroconversão (dias 15 e 30). Os resultados obtidos neste estudo confirmaram os dados previamente obtidos, sugerindo que um microambiente com perfil misto de citocinas deve ser essencial para o estabelecimento de mecanismos protetores induzidos pela vacina

antiamarílica 17DD e ausência de efeitos adversos. Em nosso trabalho 1, a contribuição mais importante foi a identificação das células produtoras das citocinas pró-inflamatórias e reguladoras responsáveis para o estabelecimento deste microambiente.

A avaliação imunológica de um caso de reação adversa à vacinação antiamarílica abordada no artigo 2 vem contribuir para o conhecimento dos mecanismos da resposta imune celular, que possam estar relacionados com o aparecimento de efeitos adversos graves induzidos pela vacina. Os aspectos imunológicos de um caso de evento adverso neurotrópico e viscerotrópico grave associado à vacinação antiamarílica 17D foram analisados e os dados demonstraram o estabelecimento de uma resposta imune adaptativa robusta, com elevada síntese de citocinas por células T CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos B, na presença de eventos desconexos da imunidade inata, com exacerbada síntese de citocinas por células NK e deficiência na ativação de monócitos.

Dentre os vários fatores que têm contribuído para o conhecimento limitado dos aspectos envolvidos no desencadeamento de efeito adverso, está o reduzido número de casos investigados, seja pela dificuldade de se identificar precocemente o quadro de reação adversa, uma vez que os sinais e sintomas prodrômicos não são reconhecidos e não são sugestivos de um quadro de febre amarela causada por vírus selvagem, no caso da doença viscerotrópica, ou pelo fato de que normalmente são casos isolados, que não podem ser relacionados a um lote específico da vacina. Os dados até agora descritos na literatura sugerem que fatores de predisposição individual, embora desconhecidos, possam estar relacionados ao desencadeamento de efeito adverso grave após a vacinação, pois não se encontraram mutações nos vírus ou problemas relacionados à qualidade das vacinas. Anormalidades na resposta imune inata e aumento de citocinas e quimiocinas já foram descritas anteriormente em outros casos de reação adversa. O resultado descrito neste trabalho 2 vem se somar aos demais e contribuir para ampliar o conhecimento dos mecanismos envolvidos em eventos adversos graves.

No artigo 3 foi descrita a avaliação da assinatura de citocinas em células da imunidade inata e adaptativa em crianças após vacinação antiamarílica 17DD, bem como a associação dos perfis observados aos níveis de anticorpos neutralizantes apresentados após a vacinação. Para a investigação, as crianças foram classificadas de acordo com os níveis de anticorpos neutralizantes em: não respondedoras (PV-PRNT⁻), respondedoras (PV-PRNT⁺), respondedoras à

revacinação (RV-PRNT⁺). O grupo PV-PRNT⁺ foi subdividido em PV-PRNT^{+médio} e (PV-PRNT^{+altos}). A análise dos dados demonstrou que à semelhança de adultos primovacinados, os leucócitos circulantes das crianças respondedoras, tanto à primovacinação quanto à revacinação, foram capazes de montar, em resposta ao antígeno amarelo, uma resposta balanceada de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, com envolvimento da imunidade inata e adaptativa. Por outro lado, os leucócitos circulantes das crianças não respondedoras à primovacinação não foram capazes de montar uma resposta balanceada de citocinas, apresentando lacunas importantes de citocinas pró-inflamatórias da imunidade inata e elevação de citocinas reguladoras da imunidade adaptativa. Interessantemente, a revacinação das crianças não respondedoras foi capaz de modificar a assinatura de citocinas, restaurando o perfil pró-inflamatório da resposta imune inata (exceto em células NK), bem como a resposta mista pró-inflamatória e reguladora da imunidade adaptativa. A assinatura apresentada pelas células das crianças não submetidas à vacinação anti-amarela foi semelhante àquela observada em crianças primovacinadas não respondedoras. E, foi demonstrado também, que existe associação entre os níveis séricos de anticorpos neutralizantes anti-amarelos 17DD observados em resposta à primovacinação e a assinatura de citocinas em leucócitos circulantes. O estímulo por antígenos vacinais 17DD *in vitro* foi capaz de induzir, nas crianças que apresentaram títulos médios de anticorpos neutralizantes (PV-PRNT^{MÉDIO+}), um perfil balanceado de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras em células da imunidade inata e adaptativa. Por outro lado, uma assinatura polarizada reguladora foi observada no grupo de crianças primovacinadas não respondedoras e uma assinatura proeminente pró-inflamatória no grupo de crianças que apresentam títulos altos de anticorpos neutralizantes após a primovacinação (PV-PRNT^{ALTO+}).

Em conjunto os conhecimentos científicos que estes 3 estudos proporcionaram sugerem que o desenvolvimento de uma resposta imune ampla e polifuncional, integrando um grande contingente de células da imunidade inata e adaptativa, parece ser a chave das bases celulares e moleculares da resposta anti-amarela eficaz, isenta de reações adversas graves em adultos e crianças. E que deficiências no sistema imune inato, principalmente no eixo neutrofílico/monocítico/macrofágico aparecem como principais alterações associadas aos eventos adversos graves e episódios de ausência de soroconversão em crianças. Os dados até agora obtidos vem contribuir para o conhecimento dos mecanismos da resposta imune desencadeados pela vacinação e abrem novas

possibilidades de investigações futuras focalizadas em estudos comparativos mais detalhados acerca da natureza molecular da imunidade antiamarílica pós-vacinal e de outros casos de eventos adversos pós-vacinais.

6 ANEXO

Produção científica

Martins MA, Silva ML, Elói-Santos SM, Ribeiro JG, Peruhype-Magalhães V, Marciano APV, Homma A, Kroon EG, Carvalho AT, Martins-Filho OA. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine*. 2008;26:1173-1184.

Silveira-Lemos D, Martins MA, Silva ML, Homma A, Carvalho AT, Martins-Filho OA. Insights on yellow fever immune response following natural infection and vaccination. *Current Trends in Immunology*. 2008, 9:1-14.

Silva ML, Espirito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Peruhype-Magalhães V, Caminha RC, De Andrade Maranhão-Filho P, Auxiliadora-Martins M, De Menezes Martins R, Galler R, Da Silva FM, Marcovitz R, Homma A, Teuwen DE, Elói-Santos SM, Andrade MC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009; 17:118-6.doi:10.1128/CVI.00369-09.

Silva ML, Martins MA, Espírito-Santo LR, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JGL, Homma A, Kroon EG, Teixeira-Carvalho A, Elói-Santos SM, Martins-Filho AO. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine*. 2011; 29:583-92. doi:10.1016/j.Vaccine, 2010.08.046.

Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Sathler Avelar R, Silveira-Lemos D, Camacho LAB, Martins RM, Maia MLS, Farias RHG, Freire MS, Galler R, Homma A, Ribeiro JGL, Lemos JAC, Auxiliadora-Martins M, Elói-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO. Cytokine Signatures of innate and adaptive immunity in 17DD Yellow Fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(6):873-83. doi:10.1093/infdis/jir439.

7 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization [internet]. Yellow fever. Fact sheet n. 100. Geneva [January 2011; acesso em 04 de junho 2011]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/#>.
2. Robertson SE, Hull BP, Tomori O, Bele O, LeDuc JW, Esteves K. Yellow fever: a decade of reemergence. *JAMA* 1996; Oct 9;276(14):1157-62.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7. ed. Brasília: MS, 2009. 816 p. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf. Acesso em: 03 nov. 2011. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener - <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>
4. Mondet B, Travassos da Rosa APA and Vasconcelos PFC. Les risques d'épidémisation urbaine de la fièvre jaune au Brésil pour le vecteurs *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1996;89:107-14.
5. Vasconcelos, PFC. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. *Rev Bras Epidemiol* 1996;5(2):244-58.
6. Massad E, Coutinho FAB, Burattini MN, Lopez LF. The risk of yellow fever in a dengue-infested area. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:370-04.
7. Codec CT, Luz PM, Struchiner CJ. Risk assessment of yellow fever urbanization in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004;98:702-10.
8. Gardner CL and Ryman KD. Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clin Lab Med* 2010;30:237-60.
9. Wang E, Weaver SC, Shope RE, Tesh RB, Watts DM, Barrett ADT. Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3' noncoding region of strains from Africa. *Virology* 1996 Nov;225(2):274-81
10. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 1985;229(4715):726-33.

11. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990;44:649-88.
12. Op de Beeck A, Rouille Y, Caron M, Duvet S, Dubuisson J. The transmembrane domains of the prM and E proteins of yellow fever virus are endoplasmic reticulum localization signals. *J Virol* 2004;78:12591-602.
13. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 2005 Jan;3(1):13-22.
14. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003;59:23-61.
15. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 2004 Jan 22;427(6972):313-19.
16. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 2001 Aug;1(1):11-20.
17. Vasconcelos PFC. Febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003 Mar/Apr;36(2):275-93.
18. Beaty BJ, Tesh RB, Aitken THG. Transovarial Transmission of Yellow Fever Virus in *Stegomyia* Mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 1980;29(1):125-32.
19. Dutary BE and Leduc JW. Transovarial transmission of yellow fever virus by a sylvatic vector, *Haemagogus equinus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981;75(1):128.
20. Vasconcelos PFC. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização febre amarela: reflexões sobre a doença. *Rev Bras Epidemiol* 2002 Dec;5(3):244-58.
21. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Travelers' Health. Yellow Book. Chapter 2. The Pre-Travel Consultation. Travel-Related Vaccine-Preventable Diseases. Yellow Fever [internet]. Atlanta. USA. [atualizada em 6 de maio de 2011; acesso em 04 de junho de 2011]. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/yellow-fever.htm>.
22. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Centro de Informação em Saúde para Viajantes (Cives). Febre amarela [internet]. Rio de Janeiro. [Atualizada em 05/04/2009; acesso em 04/04/2011]. Disponível em: <http://www.cives.ufrj.br/informacao/fam/fam-iv.html>.

23. Segura MNO, Monteiro HAO, Lopes ES, Silva OV, Castro FC, Vasconcelos PFC. Encontro de *Aedes albopictus* no Estado do Pará, Brasil. Rev Saúde Pública 2003;37(3):388-89.
24. Franco O. História da febre amarela no Brasil. Rev bras malariol doenças trop. 1969 21:315-520.
25. van der Stuyft P, Gianella A, Pirard M, Céspedes J, Lora J, Peredo C, et al. Urbanisation of yellow fever in Santa Cruz, Bolívia. Lancet 1999;353:1558-62.
26. Pan American Health Organization [internet]. Yellow fever in Paraguay. EID Updates: Emerging and Reemerging Infectious Diseases, Region of the Americas. Vol. 5. No. 5. [20 February 2008; acesso em 5 de Junho 2011]. Disponível em: <http://www.paho.org/English/ad/dpc/cd/eid-eer-2008-02-20.htm>
27. Amaral R, Tauil PL. Duas ameaças de um mosquito: febre amarela e dengue. Saúde Bras 1983; 4:236-38.
28. São Paulo. Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac. Divisão de Imunização. Divisão de Zoonoses e de Doenças Transmitidas por Vetores. Informe Técnico: Febre Amarela. São Paulo: SES/SP/CVE. 2006. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/zoo/FA_INFORME.htm. Acesso em: 03 nov. 2011.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Febre amarela Silvestre, Brasil, 2009. Boletim de atualização – Dezembro/2009. Situação Epidemiológica Atual no Brasil (2008/2009) [internet] [acesso em 17 Jul. 2010]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_febre_amarela_09_12_09.pdf.
30. Vasconcelos PFC. Febre amarela. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pediatria; 2000.
31. Monath TP, Centron MS, Teuwen DE. Yellow Fever. In: Plotkin AS, Oresteina WA, editores. Vaccines, 5nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2008. P. 959-1055.
32. World Health Organization. Global programme for vaccines and immunization. Expanded programme on immunization. Yellow fever. Geneva: World Health Organization, 1998; 1–87. [acesso em Maio de 2010]. Disponível em: <http://www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF/www9842.pdf>.

33. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Yellow Fever Vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 2010 July 30; 59(RR-7):32p.
34. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Divisão de Zoonoses - CVE-SES/SP. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac” [internet]. Recomendações de vacinação de febre amarela. [Atualizada em 25-02-2010; acesso em 25.05.2011]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/cve_febam.html.
35. World Health Organization [internet]. World Health Assembly. Application of the International Health Regulations (2005). WHA59.3. 26. Geneva. [May 2008; acesso em 25 maio. 2011]. Disponível em: <http://www.who.int/ihr/9789241596664/en/index.html>.
36. Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. J Exp Med 1937 May 31;65(6):787–800.
37. Robertson S. The immunological basis for immunization series: Yellow fever. World Health Organization (Document WHO/EPI/ GEN/93.18) [internet]. Geneva, 1993. [Acesso em Maio 2010]. Disponível em: < http://www.who.int/immunization/documents/WHO_EPI_GEN_93.18/en/index.html>.
38. Santos CND, Post PR, Carvalho R, Ferreira II, Rice CM, Galler R. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. Virus Res 1995;35:35-41.
39. Galler R, Post PR, Santos CND and Ferreira II. Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains. Vaccine 1998;16(9/10):1024-28.
40. Mem Inst Oswaldo Cruz *On-Line* [internet]. Yellow fever control in Brazil: early history. Rio de Janeiro. [2001 Aug; acesso em: Jul. 2010]. 96(6):849-57. Disponível em: <http://www.memorias.ioc.Fiocruz.br/966/4190yfc.html>.
41. Post PR, Carvalho R, Freire, Galler, R. The Early Use of Yellow Fever Virus Strain 17D for Vaccine Production in Brazil – A Review Mem Inst Oswaldo Cruz 2001 Aug;96(6):849-57.
42. Barrett ADT, Teuwen DE. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? Curr Opin Immunol 2009 Jun;21(3):308-13.

43. Freestone DS. Yellow Fever Vaccine. In: Plotkin SA & Mortimer EA, editors. Vaccines. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company USA; 1994. P. 741-79.
44. World Health Organization. Expert Committee on Biological Standardization. The Production and Testing of the WHO Yellow Fever Primary Sedd Virus Lot 213/77. WHO/BS/83.1430. Geneva, 12-18 June 1984. Mimeo 45 p.
45. Wilson ME, Chen LH, Barnett ED. Yellow fever immunizations: indications and risks. *Curr Infect Dis Rep* 2004 Feb;6(1):34-42.
46. World Health Organization. Global Programme for Vaccines and Immunization / Division of Emerging and Other Communicable Diseases Surveillance and Control. Yellow Fever – Technical Consensus Meeting. Documento WHO/EPI/GEN/98.08. Geneva. 1998 2-3 March.
47. Freestone DS, Ferris RD, Weinberg AL, Kelly A. Stabilized strain yellow fever vaccine: dose response studies, clinical reactions and effects on hepatic function. *J Biol Stand* 1977 Jul;5(3):181-86.
48. Ryman KD, Xie H, Ledger TN, Campbell GA, Barrett ADT. Antigenic variants of yellow fever virus with an altered neurovirulence phenotype in mice. *Virology* 1997 Apr;230(2):376-80.
49. Barrett ADT. Yellow Fever Vaccines. *Biologicals* 1997;25:17-25.
50. Monath TP, Kinney M, Schlesinger JJ. Ontogeny of Yellow Fever 17D Vaccine: RNA Oligonucleotide Fingerprint and Monoclonal Antibody Analyses of Vaccines Produced World-wide. *J Gen Virol* 1983;64:627-37.
51. Hahn CS, Dalrymple JM, Strauss JH, Rice CM. Comparison of the virulent Asibi strain of Yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1987;84:2019–23.
52. Sil BK, Dunster LM, Ledger TN, Wills MR, Minor PD, Barrett AD. Identification of envelope protein epitopes that are important in the attenuation process of wild-type yellow fever virus. *J Virol* 1992 July;66(7):4265-270.
53. Barrett ADT, Pryde A, Medlen AR, Ledger TN, Whitby JE, Gibson CA, et al. Examination of the envelope glycoprotein of yellow fever vaccine viruses with monoclonal antibodies. *Vaccine* 1989;7:333-36.

54. Ledger TN, Sil BK, Wills MR, Lewis G, Kinney RM, Jennings JR, et al. Variation in the biological function of envelope protein epitopes of yellow fever vaccine viruses detected with monoclonal antibodies. *Biologicals* 1992;20:117-28.
55. Jennings AD, Whitby JE, Minor PD, Barrett AD. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the structural protein genes of the yellow fever 17DD vaccine strain from Senegal with those of other yellow fever vaccine viruses. *Vaccine* 1993;11(6):679-81.
56. Barban V, Girerd Y, Aguirre M, Gulia S, Pétiard F, Riou P, et al. High stability of yellow fever 17D-204 vaccine: A 12-year retrospective analysis of large-scale production. *Vaccine* 2007 Apr;25(15):2941-50.
57. Monath TP. Neutralizing antibody responses in the major immunoglobulin classes to yellow fever 17D vaccination of humans. *Am J Epidemiol* 1971 Feb;93(2):122-9.
58. Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'age-Stehr J. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *J Med Virol* 1998 Oct;56(2):159-67.
59. Hacker UT, Jelinek T, Erhardt S, Eigler A, Hartmann G, Nothdurft HD, et al. In vivo synthesis of tumor necrosis factor-alpha in healthy humans after live yellow fever vaccination. *J Infect Dis* 1998;177(3):774-8.
60. Monath TP, McCarthy K, Bedford P, et al. Clinical proof of principle for ChimeriVax: recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine* 2002;20:1004-18.
61. Camacho LAB, Aguiar SG, Freire MS, Leal MLF, Nascimento JPN, Iguchi T, et al. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. Reatogenicidade de vacinas contra febre amarela em estudo randomizado, controlado com placebo. *Rev Saúde Pública* 2005;39(3):413-20.
62. Henderson BE, Cheshire PP, Kirya GB, Lule M. Immunological studies with yellow fever and selected African group B arboviruses in rhesus and vervet monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 1970;19:110-18.
63. Theiler M, Anderson CR. The relative resistance of dengue-immune monkeys to yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg* 1975;24(1):115-17.

64. Bancroft WH, Scott RM, Eckels KH, Hoke CH Jr, Simms TE, Jesrani KD, et al. Dengue virus type 2 vaccine: reactogenicity and immunogenicity in soldiers. *J Infect Dis* 1984 Jun;149(6):1005-10.
65. Eckels KH, Kliks SC, Dubois DR, Wahl LM, Bancroft WH. The association of enhancing antibodies with seroconversion in humans receiving a dengue-2 live-virus vaccine. *J Immunol* 1985;135(6):4201-203.
66. Shope RE and Meegan JM. Arboviruses, In: Evans AS and Kaslow RA. Eds. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. 4th ed. New York: Plenum Publishing Corporation; 1997. P. 151-179.
67. Smith CEG, Turner LH & Armitage P. Yellow fever vaccination in Malaya by subcutaneous injection and multiple puncture. *Bull World Health Organ* 1962;27:717-27.
68. Fabiyi A, MacNamara FN. The Effect of Heterologous antibodies on the serological conversion rate after 17D yellow fever vaccination. *Am J Trop Med Hyg* 1962;11(6):817-21.
69. Rosenzweig EC, Babione RW, Wisseman CL Jr. Immunological studies with group B arthropod-borne viruses. IV. Persistence of yellow fever antibodies following vaccination with 17D strain yellow fever vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 1963;12:230-5.
70. van der Beek M, Visser L, de Maat M. Yellow fever vaccination as a model to study the response to stimulation of the inflammation system. *Vascul Pharmacol* 2002;39:117-121.
71. Verschuur M, van der Beek MT, Tak HS, Visser LG, de Maat MP. Interindividual variation in the response by fibrinogen, C-reactive protein and interleukin-6 to yellow fever vaccination. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004 Jul;15(5):399-404.
72. Bonnevie-Nielson V, Heron I, Kristensen T et al. Postimmunization activity of oligoadenylate synthetase in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals. *J Clin Lab Immunol* 1989;28:155-60.
73. Lobigs M, Arthur CE, Müllbacher A, Blanden RV. The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology* 1994;202:195-201.

74. van der Most RG, Harrington LE, Giuggio V, Mahar PL, Ahmed R. Yellow fever virus 17D envelope and NS3 proteins are major targets of the antiviral T cell response in mice. *Virology* 2002 Apr 25;296(1):117-24.
75. Co MD, Terajima M, Cruz J, Ennis FA, Rothman AL. Human cytotoxic T lymphocyte responses to live attenuated 17D yellow fever vaccine: identification of HLA-B35-restricted CTL epitopes on nonstructural proteins NS1, NS2b, NS3, and the structural protein E. *Virology* 2002 Feb 1;293(1):151-63.
76. Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, et al. Human effector and memory CD8⁺ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* 2008 May;28(5):710-22.
77. Wrammert J, Miller J, Akondy R and Ahmed R. Human Immune Memory to Yellow Fever and Smallpox Vaccination. *J Clin Immunol* 2009;29:151-57.
78. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, et al. The Yellow Fever Virus Vaccine Induces a Broad and Polyfunctional Human Memory CD8⁺ T Cell Response. *J Immunol* 2009;183:7919-930.
79. Takeuchi O & Akira S. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev* 2007;220:214-24.
80. Steinman RM. & Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007;449:419-26.
81. Liprand F & Walder R. Replication of virulent and attenuated strains of yellow fever virus in human monocytes and macrophage-like cells (U937). *Arch Virol* 1983;76:51-61.
82. Marianneau P, Steffan A.-M, Royer C, Drouet M-T, Jaeck D, Kirn A, et al. Infection of primary cultures of human Kupffer cells by dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. *J Virol* 1999;73:5201-206.
83. Barros VED, Thomazini JA and Figueiredo LTM. Cytopathological changes induced by selected Brazilian flaviviruses in mouse macrophages. *J Microsc* 2004;216:5-14.
84. Palmer DR, Fernandez S, Bisbing J, Peachman KK, Rao M, Barvir D, et al. Restricted replication and lysosomal trafficking of yellow fever 17D vaccine virus in human dendritic cells. *J Gen Virol* 2007;88(Pt 1):148-56.

85. Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med* 2005;202(9):1179-184.
86. Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med* 2006;203(2):413-24.
87. Neves PC, Matos DC, Marcovistz R, Galler R. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine* 2009;27(41):5543-549.
88. Querec TD, Pulendran B. Understanding the role of innate immunity in the mechanism of action of the live attenuated Yellow Fever Vaccine 17D. *Adv Exp Med Biol* 2007;590:43-53.
89. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med* 2008;205(13):3119-131.
90. Rosa SC, Lu FX, Yu J, Perfetto SP, Falloon J, Moser S, et al. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. *J Immunol* 2004;173:5372-380.
91. Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nat rev immunol* 2009;(9):741-47.
92. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 2009;10(1):116-25.
93. Santos AP, Bertho AL, Dias DC, Santos JR, Marcovistz R. Lymphocyte subset analyses in healthy adults vaccinated with yellow fever 17DD virus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 May;100(3):331-37.
94. Martins MA. Estudo da resposta Imune celular desencadeada pela vacina antiamarílica 17DD [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.
95. Martins MA, Silva ML, Marciano AP, Peruhype-Magalhaes V, Eloi-Santos SM, Ribeiro JGL, 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? *Clin Exp Immunol* 2007 April;148(1):90-100.

96. Martins MA, Silva ML, Eloi-Santos SM, Ribeiro JG, Peruhype-Magalhães V, Marciano APV, et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine* 2008;26:1173-184
97. Silva ML. Padrão de Citocinas intracelulares em leucócitos circulantes de voluntários primovacinados com a vacina 17DD contra a febre amarela [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2005.
98. Santos AP, Matos DC, Bertho AL, Mendonça SC, Marcovistz R. Detection of Th1/Th2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccines through ELISpot assay. *Cytokine* 2008;42(2):152-55.
99. Soper FL. Vacinação contra a febre amarela no Brasil, de 1930 a 1937. *Arch Hyg* 1937;7:379-90.
100. Fox JP, Cunha JF, Kossobudzki SL. Additional observations on the duration of humoral immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus. *Am J Hyg* 1948;47:64-70.
101. Wisseman CL Jr, Sweet BH, Kitaoka M, Tamiya T. Immunological studies with group B arthropod-borne viruses. I. Broadened neutralizing antibody spectrum induced by strain 17D yellow fever vaccine in human subjects previously infected with Japanese encephalitis virus. *Am J Trop Med Hyg* 1962 Jul;11:550-561.
102. Niedrig M, Lademann M, Emmerich P, Lafrenz M. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Trop Med Int Health* 1999 Dec;4(12):867-71.
103. Brandriss MW, Schlesinger JJ, Walsh EE. Immunogenicity of a purified fragment of 17D yellow fever envelope protein. *J Infect Dis* 1990;61(6):1134-139.
104. Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30- 35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ* 1981;59(6):895-900.
105. Meyer HM Jr, Hostetler DD Jr, Bernhein BC, Rogers NG, Lambin P, Chassary A, et al. Response of Volta children to jet inoculation of combined live measles, smallpox and yellow fever vaccines. *Bull World Health Organ* 1964;30:783-94.

106. Lhuillier M, Mazzariol MJ, Zadi S, Le Cam N, Bentejac MC, Adamowicz L, et al. Study of combined vaccination against yellow fever and measles in infants from six to nine months. *J Biol Stand* 1989;17:9-15.
107. Mouchon D, Pignon D, Vicens R et al. Étude de la vaccination combine rougeole-fièvre jaune chez l'infant africain agé de 6 a 10 mois. *Bull Soc Path Ex* 1990;83:537-51.
108. Osinusi K, Akinkugbe FM, Akinwolere OA, Fabiyi A. Safety and efficacy of yellow fever vaccine in children less than one-year-old. *West Afr J Med* 1990 Jul-Sep;9(3):200-03.
109. Adu FD, Omotade OO, Oyedele OI, Ikusika O, Odemuyiwa SO, Onoja AL. Field trial of combined yellow fever and measles vaccines among children in Nigeria. *East Afr Med J* 1996 Sep;73(9):579-82.
110. Stefano I, Sato HK, Pannuti CS, Omoto TM, Mann G, Freire MS, at al. Recent immunization against measles does not interfere with the sero-response to yellow fever vaccine *Vaccine* 1999 March;17(9-10):1042-46.
111. Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações para o estudo da soroconversão pela vacina contra febre amarela. Estudo multicêntrico de soroconversão pela vacina contra febre amarela. *Ciênc saúde colet* 2003;8 (Suppl. 2):511.
112. Kelso JM, Mootrey GT, Tsai TFJ. Anaphylaxis from yellow fever vaccine. *Allergy Clin Immunol* 1999 Apr;103(4):698-01.
113. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Manual de vigilância epidemiológica dos eventos adversos pós-vacinação. 2ª. ed. Brasília, 2008;18 p.
114. Vasconcelos PFC, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VLRS, at al. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *Lancet* 2001;358:91-7.
115. Chan RC, Penney DJ, Little D, Carter IW, Roberts JA, Rawlinson WD. Hepatitis and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine. *Lancet* 2001 Jul 14;358(9276):121-22.

116. Martin M, Tsai TF, Cropp B, Chang GJ, Holmes DA, Tseng J. et al. Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of four cases. *Lancet* 2001 Jul 14;358(9276):98-104.

117. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fever, jaundice, and multiple organ system failure associated with 17D-derived yellow fever vaccination, 1996-2001 *MMWR* 2001 Aug 3;50(30):643-5. Acesso em: Jul. 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5030a3.htm>.

118. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Adverse Events Associated with 17D-Derived Yellow Fever Vaccination - United States, 2001-2002. *MMWR* 2002 Nov 8;51(44):989-93.

119. Struchiner CJ, Luz PM, Dourado I, Sato HK, Aguiar SG, Ribeiro JGL, et al. Risk of fatal adverse events associated with 17DD yellow fever vaccine. *Epidemiol Infect* 2004;132:939-46.

120. Engel AR, Vasconcelose PFC, McArthur MA, Barrett ADT. Characterization of a viscerotropic yellow fever vaccine variant from a patient in Brazil. *Vaccine* 2006 Apr; 24(15):2803-809.

121. McMahon AW, Eidex RB, Marfin AA, Russell M, Sejvar JJ, Markoff L, et al. Neurologic disease associated with 17D-204 yellow fever vaccination: a report of 15 cases. Yellow Fever Working Group. *Vaccine* 2007;25(10):1727-734.

122. Hayes EB. Acute viscerotropic disease following vaccination against yellow fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007;101(10):967-71.

123. Lindsey NP, Schroeder BA, Miller ER, Braun MM, Hinckley AF, Marano N, et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine* 2008 Nov 11;26(48):6077-82.

124. Pan American Health Organization [internet]. Final statement by the Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO) on investigation of serious adverse events in Peru following receipt of yellow fever vaccine produced by Bio-manguinhos, Brazil. Washington [2008 Aug 11; acesso em 22 Jul. 2010]. Disponível em: <http://www.paho.org/English/adhpccdeid-eer-2008-03-27.htm>.

125. Whittembury A, Ramirez G, Hernández H, Roper AM, Waterman S, Ticona M, et al. Viscerotropic disease following yellow fever vaccination in Peru. *Vaccine* 2009;27:5974-981.

126. World Health Organization: Global Advisory Committee on Vaccine Safety. *Weekly Epidemiol Rec* 2008;83(32):285-92.
127. Martins RM, Maia MLS, Santos EM, Cruz RLS, dos Santos PRG, Carvalho SMD et al. Yellow fever vaccine post-marketing surveillance in Brazil. *Procedia Vaccinol* 2010;2:178-83.
128. Monath TP. Short Report: Suspected Yellow Fever Vaccine-Associated Viscerotropic Adverse Events (1973 and 1978), United States. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82(5):919-21.
129. Silva ML, Espírito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Peruhype-Magalhães V, Caminha RC, et al. Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17(1):118-26.
130. Douce RW, Freire D, Tello B and Vásquez GA. A Case of Yellow Fever Vaccine–Associated Viscerotropic Disease in Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 2010 April;82(4):740-42.
131. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Yellow Fever Vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2010;July 30,59:RR-7.
132. Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Eventos Adversos sérios Associados com a vacina 17D Contra Febre Amarela. Brasília. Ministério da Saúde. 2000;23p.
133. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Transmission of yellow fever vaccine virus through breast-feeding - Brazil, 2009 – Brazil. *MMWR* 2010 Feb. 12;59(05):130-32.
134. Deubel V, Huerre M, Cathomas G, Drouet M-T, Wuscher N, Le Guenno, et al. Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-vaccinated fatal human case. *J Med Virol* 1997;53:212-17.
135. Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Análise molecular dos vírus de febre amarela vacinal cepa 17DD associados a eventos pós-vacinais no Brasil. Brasília. Ministério da Saúde. 2000;11p.

136. Galler R, Pugachev KV, Santos CLS, Ocran SW, Jabor AV, Rodrigues SG, et al. Phenotypic and molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. *Virology* 2001;290(2):309-19.
137. Bae HG, Domingo C, Tenorio A, de Ory F, Muñoz J, Weber P, et al. Immune response during adverse events after 17D-derived yellow fever vaccination in Europe. *J Infect Dis* 2008;197(11):1577-584.
138. Belsher JL, Gay P, Brinton M, DellaValla J, Ridenour R, Lanciotti R, et al. Fatal multiorgan failure due to yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease. *Vaccine* 2007;25(50):8480-485.
139. Pulendran B, Miller J, Querec TD, Akondy R, Moseley N, Laur O, Glidewell J et al. Case of yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes. *J Infect Dis* 2008;198(4):500-07.
140. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Faria AM, et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol* 2008;68:516-25.
141. Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Rocha MO, Moreira MC, Lemos EM, Luz ZM, et al. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res* 1998 Jan;31(1):127-31.
142. Collaborative group for studies with yellow fever vaccine. Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: implications for the Brazilian National Immunization Program. *Vaccine* 2007 Apr 20;25(16):3118-123.
143. Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz). Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) Vacina contra febre amarela. Bulas. [internet]. Acesso em: 14 Jul. 2010. Disponível em: <http://www.Fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=208>.
144. Schmidt NJ. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5th. ed. Washington: American Public Health Association. 1979;65-134.
145. Dobler G, Jelinek T, Frosner G, Nothdurft H, Loscher T. Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis. *Wien Med Wochenschr* 1997;147:463-64.

146. Peruhype-Magalhães V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva L de A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 2006;146(1):124-32.