

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

**DURAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR DOSES MENORES DA VACINA
ANTIAMARÍLICA 17DD OITO ANOS APÓS A PRIMOVACINAÇÃO**

por

Ismael Artur da Costa Rocha

Belo Horizonte

2020

Ismael Artur da Costa Rocha

**DURAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR DOSES MENORES DA
VACINA ANTIAMARÍLICA 17DD OITO ANOS APÓS A PRIMOVACINAÇÃO**

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

Orientação: Dra. Ana Carolina Campi Azevedo
Coorientação: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Belo Horizonte
2020

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/ 6 1975

C837d Costa-Rocha, Ismael Artur da.
2020

Duração da resposta imune induzida por doses menores da vacina antiamarílica 17DD oito anos após a primovacinação / Ismael Artur da Costa Rocha. – Belo Horizonte, 2020.

XVI, 113 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 88 - 101

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática/ BCM-GB.

1. Febre Amarela 2. Vacina/administração e dosagem 3. anticorpos neutralizantes I. Título. II. Campi-Azevedo, Ana Carolina. III. Martins-Filho, Olindo Assis.

CDD – 22. ed. – 616.91

ISMAEL ARTUR DA COSTA ROCHA

**DURAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR DOSES MENORES DA
VACINA ANTIAMARÍLICA 17DD OITO ANOS APÓS A PRIMOVACINAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática

Orientadora: Dr^a. Ana Carolina Campi Azevedo

Coorientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Banca Examinadora:

Dr^a. Ana Carolina Campi Azevedo (IRR – FIOCRUZ/ MG) Orientadora/Presidente

Dr^a. Flora Satiko Kano (IRR – FIOCRUZ/ MG) Titular

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

Dr. Pedro Augusto Alves (IRR – FIOCRUZ/ MG) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 20/02/2020

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia ter se consolidada sem o apoio de tantos que me acompanharam nesses anos de mestrado. Então deixo aqui minha sincera gratidão!

Em primeiro, não podia de deixar de agradecer minha querida orientadora Carol Campi, pela pessoa e profissional que é. Obrigado pela dedicação e por sempre ser uma das pessoas que mais acredita no meu potencial. Obrigado por me “resgatar” depositando em mim tanto carinho e confiança. Sem sua orientação, apoio, confiança e amizade nada disso teria sido tão valioso da forma que foi. Saiba que você tem uma grande importância na minha vida!

Ao querido Olindo, pela sua orientação/coorientação no dia a dia. Tenho um orgulho imenso por ter compartilhado tantos dias trabalhando com você. Obrigado por tanto conhecimento transmitido. Sem seus preciosos ensinamentos esta dissertação, e tantos outros trabalhos, não teriam sido concretizados. Obrigado pela confiança e pela oportunidade de ser seu aluno!

A Andrea Teixeira, por se empenhar tanto em auxiliar a todos. Obrigado pelos ensinamentos diários na pesquisa e no cotidiano. Seu apoio foi fundamental!

Aos meus pais, Maria Geralda e Hercílio, por sempre desejarem o melhor para mim. Pelo esforço integral que fizeram/fazem para que eu possa superar cada obstáculo encontrado! Obrigado pelo amor imenso que sentem por mim e por entenderem minha ausência em tantos momentos!

A minha irmã, Leila, por sempre se orgulhar de minhas conquistas. E ser essa pessoa tão adorável. Obrigado por estar do meu lado mesmo com tanta distância entre nós.

Ao Gabriel Amato que nos últimos anos se tornou uma das pessoas mais importantes e fundamentais na minha vida, tão presente e próximo, sempre me inspirando ser mais do que já fui até hoje! Obrigado por ser quem é na minha vida!

Aos amigos de Pós-Graduação e da vida, Bruna Diniz, Malu Lima, Thalles Lopes, Jordana Fradico, Ágata Lopes, Luana Fernandes, Luciene Pimenta, Laise Reis, Guilherme Caetano, pelos bons momentos vividos juntos, deixando tudo muito mais leve. Obrigado por me ensinarem tanto, irei leva-los para todo o sempre!

Um obrigado especial à Bruna, que se demonstrou ser luz em tempos tão nebulosos. Obrigado pela confiança e companheirismo no dia a dia.

A essas pessoas incríveis que apareceram na minha vida, Carol Rosseti, Gabriel Nascimento, Raíssa Brescia, André (Dekinha), Luiza Morais, Igor Cardoso, Aline Lemos e Taciana Garrido, obrigado por me demonstrarem sempre o melhor sentimento de todos – a amizade!

Ao Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores (GIPB) pelo acolhimento tão afetuoso nesses meus poucos anos de “casa”. Um agradecimento especial a Jucélia, membro tão fundamental para todos nós, obrigado pela amizade e preocupação constante.

As queridas e amigas, Jordana Fradico e Dayane Otta pelo apoio incondicional na realização dos experimentos.

A todo o grupo de Febre Amarela do GIPB. A concretização deste trabalho só foi possível por conta de toda a estrutura já fundamentada por todos vocês.

Ao apoio técnico do GIPB e ao corpo técnico da Plataforma de Citometria de Fluxo, pelo suporte, carinho e competência de sempre.

Agradeço a FIOCRUZ-Minas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por me proporcionar um aperfeiçoamento gratuito e de excelência.

A todos os professores e funcionários do PPG – Ciências da Saúde.

A biblioteca do IRR e seus funcionários em prover acesso a uma gama de informações primordiais para a construção deste trabalho e no cotidiano das disciplinas.

Aos órgãos financiadores: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Wellcome Trust.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta na conclusão deste trabalho.

RESUMO

A Febre Amarela é historicamente considerada uma das doenças infecciosas mais perigosas e como não há tratamento específico para a doença, a vacinação se torna a principal medida para seu controle. A crescente ocorrência de surtos em países da África e no Brasil vem aumentando a demanda pela vacina e induzindo um esgotamento dos estoques internacionais. Neste contexto, em 2009, Bio-Manguinhos iniciou um estudo clínico de dose resposta da vacina 17DD contra febre amarela, no qual a vacina foi reformulada em 6 doses decrescentes: 27.476UI (dose plena, considerada referência), 10.447UI, 3.013UI, 587UI, 158UI e 31UI. Este estudo avaliou a imunogenicidade das subdoses, bem como a duração da imunidade após um ano da primovacinação. No entanto, era fundamental avaliar também a duração da imunidade a longo prazo. Em 2017, oito anos após a primovacinação empregando as subdoses, tivemos a oportunidade de fazer esta avaliação em uma parceria com Bio-Manguinhos. Desta forma, o presente estudo visa avaliar aspectos fenotípicos e funcionais da memória imunológica celular, bem como, da memória humoral, no contexto da duração da resposta vacinal antiamarílica induzida pela vacina 17DD reformulada em doses menores oito anos após a primovacinação. Os resultados demonstraram que os indivíduos vacinados com doses menores apresentam níveis similares de anticorpos neutralizantes e fenótipos de memória celular, particularmente, memória central de CD4⁺ e memória efetora de CD8⁺ quando comparados com indivíduos vacinados com a dose plena de referência (27.476UI). Adicionalmente, a avaliação das proporções iterativas das taxas de soropositividade dos grupos vacinais, 8 anos após a primovacinação, revelou que apenas doses acima de 587UI induziram taxas de soropositividade aceitáveis (89, 90, 80 e 91%, respectivamente). Os dois principais correlatos de proteção (títulos de anticorpos neutralizantes e presença de memória efetora de células CD8⁺) foram similares em todos os grupos vacinais. Em conjunto, esses achados fornecem evidências positivas da duração da resposta imunológica induzida por doses menores da vacina antiamarílica 17DD administrada em 2009 e contribuem para o suporte do uso regular da estratégia de dose fracionada da vacina contra febre amarela em adultos.

Palavras-chave: febre amarela; vacina 17DD; subdoses; memória celular; anticorpos neutralizantes.

ABSTRACT

Yellow Fever is historically considered one of the most dangerous infectious diseases and as there is no specific treatment for the disease, vaccination becomes the main measure for its control. The increasing occurrence of outbreaks in countries in Africa and Brazil has been increasing demand for the vaccine and leading to a depletion of international stockpile. In this context, in 2009, Bio-Manguinhos initiated a clinical dose-response study of the 17DD yellow fever vaccine, in which the vaccine was reformulated into 6 decreasing doses: 27,476IU (full dose, considered reference), 10,447IU, 3,013IU, 587IU, 158IU and 31IU. This study evaluated the immunogenicity of subdoses as well as the duration of immunity after 1 year of primovaccination. However, it was also crucial to assess the duration of long-term immunity. In 2017, 8 years after primovaccination using subdoses, we had the opportunity to make this evaluation in a partnership with Bio-Manguinhos. Thus, the present study aims to evaluate phenotypic and functional aspects of cellular immune memory, as well as humoral memory, in the context of the duration of the anti-yellow vaccine response induced by the reformulated 17DD vaccine at lower doses eight years after primovaccination. The results demonstrated that subdose vaccinated subjects had similar levels of neutralizing antibodies and cellular memory phenotypes, particularly CD4⁺ central memory and CD8⁺ effector memory when compared to subjects vaccinated with the full reference dose (27,476UI). In addition, evaluation of the iterative proportions of seropositivity rates of vaccine groups, 8 years after primovaccination, revealed that only doses above 587IU induced acceptable seropositivity rates (89, 90, 80 and 91%, respectively). The two major correlates of protection (neutralizing antibody titers and presence of effector memory of CD8⁺ cells) were similar in all vaccine groups. Taken together, these findings provide positive evidence of the duration of the subdoses induced immune response of the 17DDvaccine administered in 2009 and support the regular use of the fractional dose yellow fever vaccine strategy in adults.

Keywords: Yellow Fever; 17DD vaccine; subdoses, neutralizing antibodies; cellular memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – página 18

Figura 2 – página 19

Figura 3 – página 21

Figura 4 – página 24

Figura 5 – página 28

Figura 6 – página 51

Figura 7 – página 54

Figura 8 – página 61

Figura 9 – página 63

Figura 10 – página 65

Figura 11 – página 69

Figura 12 – página 71

Figura 13 – página 73

Figura 14 – página 74

Figura 15 – página 76

Figura 16 – página 77

Figura 17 – página 79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – página 27

Quadro 2 – página 57

Quadro 3 – página 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – página 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------|--|
| % | - Percentual |
| °C | - Graus Celsius |
| * | - Asterisco |
| µg | - Micrograma |
| µL | - Microlitro |
| log₁₀ | - Logaritmo em base 10 |
| mL | - Mililitro |
| mM | - Milimolar |
| 17D | - Cepa 17D do vírus da Febre Amarela |
| 17DD | - Cepa 17DD do vírus da Febre Amarela |
| ACC | - Aceleração |
| ACRV | - Áreas com recomendação de vacina |
| APC | - Aloficocianina (do inglês, <i>allophycocyanin</i>) |
| ASRV | - Áreas sem recomendação de vacina |
| C | - Capsídeo (proteína de) |
| CC | - Cultura controle |
| CCR | - Receptor de quimiocina CC (do inglês, <i>CC chemokine receptor</i>) |
| CD | - do inglês, <i>cluster of differentiation</i> |
| CDC | - do inglês, <i>Centers for diseases control and prevetion</i> |
| CE | - Cultura estimulada |
| CG | - Controle de gate |
| CIC | - Citocinas intracitoplasmáticas Memória central (linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺) (do inglês, <i>central</i> |
| CM | - <i>memory</i>) e memória clássica (linfócitos B CD19 ⁺) (do inglês, <i>classical memory</i>) |
| CO₂ | - Dióxido de Carbono |
| CXCL | - Ligante de quimiocinas CXC (do inglês, <i>CXC motif chemokine</i>) |
| Cy | - Cianina (do inglês, <i>cyanine</i>) |
| DE | - Alemanha (do inglês, <i>Deutschland</i>) |
| DEC | - Desaceleração |
| DNA-VFA | - Doença neurológica associada a vacina de febre amarela |
| DVA-VFA | - Doença viscerotrópica associada a vacina de febre amarela |

| | |
|----------------|--|
| E | - Envelope (proteína de) |
| Eef | - do inglês, <i>early effector</i> (linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺) |
| ELISA | - Ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) |
| EM | - Memória efetora (linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺) (do inglês, <i>effector memory</i>) |
| ESPIN | - Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional |
| EYE | - Eliminação da Epidemia de Febre Amarela (em inglês, <i>Eliminate Yellow Fever Epidemics Strategy</i>) |
| FIOCRUZ | - Fundação Oswaldo Cruz |
| FITC | - Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, <i>Fluorescein isothiocyanate</i>) |
| FSC-A | - Dispersão frontal por área (do inglês, <i>Forward scatter - area</i>) |
| FSC-H | - Dispersão frontal por altura (do inglês, <i>Forward scatter - high</i>) |
| GAVI | - do inglês, <i>Global Alliance for Vaccines and Immunisation</i> |
| HIV | - Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, <i>human immunodeficiency vírus</i>) |
| HLA | - Antígeno leucocitário humano (do inglês, <i>Human leukocyte antigen</i>) |
| Ig | - Imunoglobulina |
| ISG56 | - Gene 56 estimulado pelo IFN (do inglês, <i>IFN stimulated gene 56</i>) |
| LB | - Linfócitos B |
| LT | - Linfócitos T |
| MLD | - Dose letal mediana (do inglês, <i>Medium Mouse Lethal Dose</i>) |
| N | - naïve (linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD19 ⁺) |
| n | - Número (amostral) |
| NCT | - Número de ensaio clínico (do inglês, <i>number of clinical trial</i>) |
| NK | - Natural killer (células) (do inglês, <i>natural killer</i>) |
| NS | - Não estrutural (proteína) (do inglês, <i>nonstructural</i>) |
| NV | - Não vacinados (grupo de estudo) |
| OMS | - Organização Mundial da Saúde |
| OPAS | - Organização Pan-Americana da Saúde |
| ORF | - Fase aberta de leitura (do inglês, <i>open reading frame</i>) |

| | |
|--------------------------------|---|
| P | - Permeabilizante a base de saponina (PBS) |
| PBMC | - Células mononucleares do sangue periférico (do inglês, <i>Peripheral blood mononuclear cell</i>) |
| PBS | - Tampão salina fosfato (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PE | - Ficoeritrina (do inglês, <i>phycoerythrin</i>) |
| PerCP | - do inglês, <i>peridinin chlorophyll protein complex</i> |
| PFU | - Unidades formadoras de placas (do inglês, <i>plaque formation units</i>) |
| pH | - Potencial hidrogeniônico |
| PHA | - Fitohemaglutinina (do inglês, <i>phytohaemagglutinin</i>) |
| PNH | - Primatas não humanos |
| PrM | - Pré-membrana (proteína de) |
| PRNT | - Teste de Neutralização por Redução em Placa de Lise (do inglês, <i>Plaque reduction neutralization test</i>) |
| PV | - Primovacinados (grupo de estudo) |
| Qdot | - do inglês, <i>Quantum Dots Technology</i> . |
| QIP | - Questionário de inclusão na pesquisa |
| r | - Coeficiente de correlação |
| RE | - Retículo endoplasmático |
| RNA | - Ácido ribonucléico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>) |
| Rpm | - Rotações por minuo |
| RPMI | - Meio de cultura RPMI (do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institut</i>) |
| SSC | - Dispersão lateral (do inglês, <i>Side scatter</i>) |
| TCLE | - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| Th | - do inglês, <i>T helper</i> (linfócitos auxiliares) |
| TLR | - Receptor toll like (do inglês, <i>Toll like receptor</i>) |
| TNF-α | - Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor –α</i>) |
| UI | - Unidades internacionais |
| UNICEF | - Fundo das Nações Unidas para a Infância (do inglês, <i>United Nations Children's Fund</i>) |
| USA | - Estados Unidos da América (do inglês, <i>United States of America</i>) |
| W | - do inglês, <i>wash</i> (PBS) |
| WHO | - do inglês, <i>World Health Organization</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 Febre Amarela..... | 17 |
| 1.1.1 Etiologia e Transmissão..... | 17 |
| 1.1.2 Epidemiologia | 21 |
| 1.1.3 Controle e prevenção..... | 26 |
| 1.2 Vacina da febre amarela..... | 30 |
| 1.2.1 Breve histórico | 30 |
| 1.2.2 Esquema Vacinal no Brasil | 32 |
| 1.2.3 Segurança e reatogenicidade | 33 |
| 1.2.4 Eficácia e imunogenicidade | 35 |
| 1.3 Resposta imune à vacina antiamarílica..... | 36 |
| 1.3.1 Resposta imune humoral | 36 |
| 1.3.2 Resposta imune celular | 38 |
| 1.3.3 Perfil funcional de citocinas e quimiocinas..... | 40 |
| 1.4 Estratégias de otimização da vacina antiamarílica | 42 |
| 1.4.1 Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio- Manguinhos/FIOCRUZ..... | 42 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 46 |
| 3 OBJETIVOS..... | 48 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 48 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 48 |
| 4 METODOLOGIA | 49 |
| 4.1 Delineamento geral | 49 |
| 4.2 Critérios de elegibilidade..... | 52 |
| 4.2.1 Critérios de inclusão | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.2 Critérios de exclusão | 52 |
| 4.3 Procedimentos laboratoriais do estudo | 53 |
| 4.3.1 Titulação de anticorpos neutralizantes (PRNT) | 53 |
| 4.3.2 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)..... | 54 |
| 4.3.3 Cultura <i>in vitro</i> antígeno-específica de longa duração | 55 |
| 4.3.4 Caracterização do perfil fenotípico de linfócitos T e B | 56 |
| 4.3.5 Caracterização do perfil funcional de linfócitos T e B produtores de citocinas..... | 57 |
| 4.4 Análise do perfil fenotípico e funcional..... | 59 |
| 4.4.1 Linfócitos T | 59 |
| 4.4.2 Linfócitos B | 62 |
| 4.4.3 Citocinas Intracitoplasmáticas..... | 64 |
| 4.5 Estratégias de análises..... | 66 |
| 4.5.1 Matrizes de redes de biomarcadores..... | 66 |
| 4.5.2 Análises estatísticas | 66 |
| 4.5.3 Proporção iterativa..... | 67 |
| 5 RESULTADOS..... | 68 |
| 5.1 Avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes específicos para febre amarela oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD | 68 |
| 5.2 Análise da proporção iterativa das taxas de soropositividade durante os tempos de análises do Estudo Dose-Resposta..... | 69 |
| 5.3 Análise dos perfis fenotípicos e funcionais de memória celular após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno vacinal 17DD. | 71 |
| 5.5 Análise comparável de matrizes de biomarcadores oito anos após a primovacinação com doses menores da 17DD | 76 |
| 5.6 Principais semelhanças dos perfis de memória humoral e celular específicos para febre amarela oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD..... | 78 |

| | |
|-------------------------------------|------------|
| 6 DISCUSSÃO | 80 |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 86 |
| 8 CONCLUSÃO | 86 |
| 9 REFERÊNCIAS..... | 88 |
| 10 APÊNDICE..... | 102 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Febre Amarela

1.1.1 Etiologia e Transmissão

A febre amarela é uma arbovirose infecciosa não contagiosa transmitida por artrópodes hematófagos, considerada historicamente uma das doenças infecciosas com maior gravidade no mundo (VASCONCELOS, 2003; MONATH e VASCONCELOS, 2015; DOUAM e PLOSS, 2018). A doença é a mesma em todas as formas clínicas, no entanto existe uma variabilidade de apresentação e manifestação dos sintomas, com formas assintomáticas, leves, moderadas ou graves. Por anos a doença e suas manifestações clínicas foram classificadas através de um padrão definido como *iceberg* da febre amarela (Figura 1) (VASCONCELOS, 2003; JOHANSSON et al., 2014), onde a forma assintomática e/ou leve ocorre em aproximadamente 90% dos casos, apresentando febre, mialgia, náusea e vômito, artralgias (VASCONCELOS, 2003; BRASIL, 2017a; WAGGONER et al., 2018; BRASIL, 2019a) sendo dificilmente diagnosticada. Somente 10% dos doentes desenvolvem formas graves, apresentando icterícia, hemorragia, falência hepato-renal, associadas com elevada letalidade (VASCONCELOS, 2003; BRASIL, 2017a). Dessa forma, pode-se perceber uma grande subnotificação nos casos da doença (VASCONCELOS, 2003; JOHANSSON et al., 2014). No entanto, em análises em coortes de indivíduos hospitalizados, um padrão diferente vem sendo observado para as formas graves da doença, com aumento da faixa de incidência para 10 a 25%, caracterizada por eventos de hepatite tardia com grande aumento de transaminases, danos cardíacos, renais e pancreáticos, hemorragia, sepsia e infecções fúngicas, hematofagocitose, alta carga viral circulante, dentre outros quadros (DUARTE-NETO et al., 2019; KALLAS et al., 2019; REZENDE et al., 2020; WILDER-SMITH et al., 2019).

Figura 1 - O “iceberg da febre amarela”. Classificação e distribuição das formas clínicas

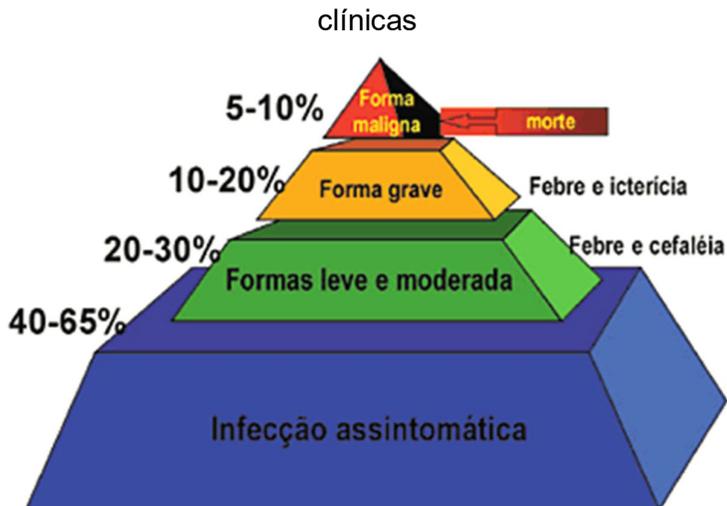


Figura 1 - O “iceberg da febre amarela”. Classificação e distribuição das formas clínicas. Representação esquemática das formas clínicas apresentadas na febre amarela. Cada forma clínica está representada com a frequência (%) no contexto da doença. Fonte: VASCONCELOS, 2003.

A febre amarela tem como agente etiológico um arbovírus (do inglês *arthropod borne virus*), pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. O vírus da febre amarela é o protótipo do gênero *Flavivirus* que contém aproximadamente 70 diferentes vírus (MONATH, 2001; BARRET e HIGGS, 2007; MONATH e VASCONCELOS, 2015). Trata-se de um vírus esférico e envelopado, que contém um genoma constituído de RNA de fita simples não segmentado com polaridade positiva, com cerca de 11.000 nucleotídeos. Codifica 3.411 aminoácidos em uma única poliproteína que é processada em dez diferentes proteínas virais: 3 proteínas estruturais (C, PrM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A–2B, NS3, NS4A–B, e NS5) (MONATH, 2001; LINDENBACH e RICE, 2003; VRATSKIKH, 2013; DOUAM e PLOSS, 2018) (Figura 2).

A função das proteínas estruturais, vem sendo descrita pela literatura, como papel fundamental na ativação da resposta imune durante a infecção (BURKE e MONATH, 2001; GARDNER e RYMAN, 2010), bem como seu papel na formação básica da partícula viral, enquanto as proteínas não estruturais estão envolvidas em atividades reguladoras e de expressão do vírus, tanto quanto na replicação e montagem de novas partículas virais (MURRAY et al., 2008; JONKER et al., 2013; DOUAM e PLOSS, 2018). A interação da partícula viral com a célula alvo ocorre por meio de receptores de superfície que auxiliam na endocitose. Uma vez internalizado,

o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma e passa por um rearranjo conformacional da proteína E no endossomo, devido ao baixo pH. Após a desmontagem do nucleocapsídeo, ocorre a translocação do genoma viral e posterior tradução das proteínas virais (GARDNER e RYMAN, 2010).

Figura 2 - Esquema representativo da partícula viral e organização genômica

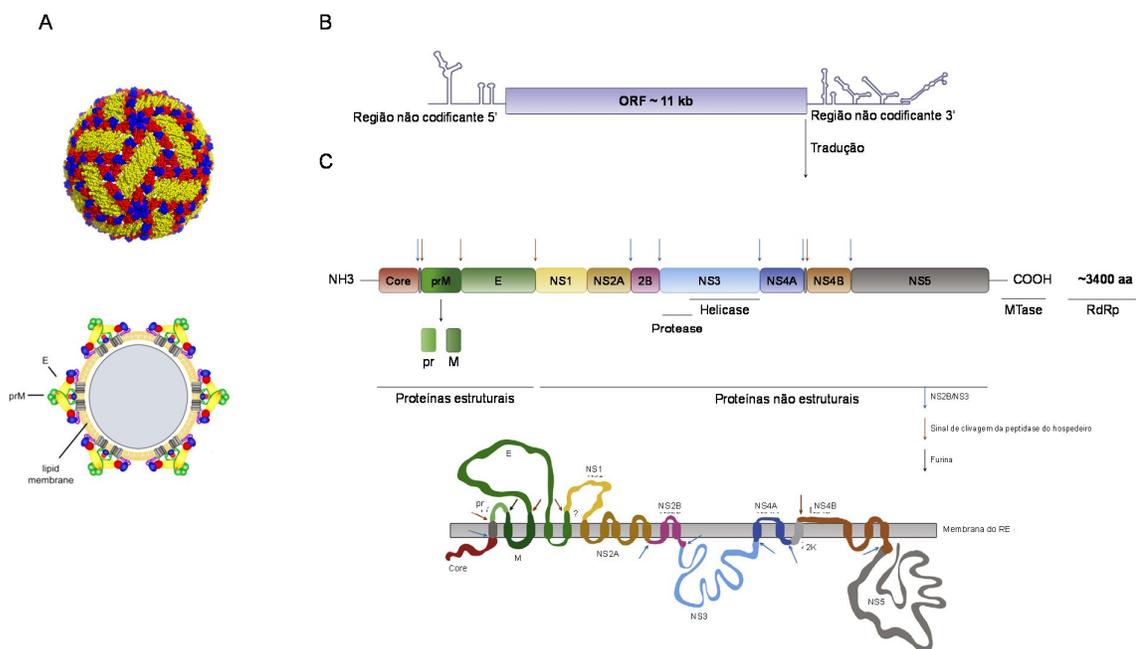


Figura 2 - Esquema representativo da partícula viral e organização genômica . (A) No painel esquerdo superior, representação do capsídeo viral de uma partícula viral madura; na parte inferior, modelo esquemático da disposição das proteínas virais em uma partícula viral imatura. (B) Representação da poliproteína do vírus da febre amarela. (C) No painel superior, representação de todas as proteínas virais e suas regiões específicas na ORF do genoma viral. Cada proteína está representada por uma cor distinta. No painel inferior, esquema representativo da poliproteína ancorada na membrana do retículo endoplasmático (RE), após a tradução. Fonte: DOUAM e PLOSS, 2018 e VRATSKIKH et al., 2013 (Adaptado).

A febre amarela é caracterizada como endêmica e enzoótica em 47 países, dos quais 34 na África e 13 nas Américas Central e do Sul. Nessas regiões, o vírus da febre amarela é transmitido por insetos hematófagos da Família Culicidae, em especial dos gêneros *Aedes*, *Haemagogus* e *Sabethes* (VASCONCELOS, 2003; MONATH e VASCONCELOS, 2015; CAVALCANTE e TAUILL, 2017; DOUAM e PLOSS, 2018). Mantida na natureza por hospedeiros vertebrados suscetíveis, principalmente primatas não humanos (PNH) selvagens, e em mosquitos

hematófagos (MONATH, 2001). São determinados, classicamente, dois ciclos de transmissão para o vírus da febre amarela: o ciclo silvestre, onde o vírus da febre amarela se encontra em maior circulação, e o urbano. Além destes dois ciclos clássicos, mosquitos do gênero *Aedes* estão introduzindo um novo de ciclo de transmissão no continente africano, principalmente nas regiões de savana, determinado como ciclo intermediário (BARRET e HIGGS, 2007; COUTO-LIMA et al., 2017) (Figura 3).

No ciclo silvestre a transmissão do vírus da febre amarela se dá pela picada de mosquitos em PNH, principais hospedeiros em florestas tropicais, embora outros vertebrados, como marsupiais, possam ser infectados e desenvolver viremias capazes de infectar os mosquitos (BARRET e HIGGS, 2007). Neste ciclo, de forma adicional pode ocorrer a participação dos humanos como hospedeiros acidentais. A infecção humana ocorre quando indivíduos não imunizados ou aqueles indivíduos que uma vez imunizados, mas que perderam correlatos de proteção antiamarilica, adentram nas áreas endêmicas para a doença, por motivos laborais ou de lazer. Nas Américas (Sul e Central), a transmissão da febre amarela silvestre é dada por mosquitos hematófagos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, enquanto na África o principal gênero participante é o *Aedes*. Em regiões secas da África, também tem sido registrado o isolamento viral em carrapatos *Amblyoma variegatum*, o que pode indicar a sua participação com um papel vetorial ou de reservatório (CDC, 2001; VASCONCELOS, 2003; LEVIN, 2011).

No ciclo urbano, o homem é o único hospedeiro e a transmissão ocorre por meio de vetores urbanos infectados, principalmente, do gênero *Aedes* (VASCONCELOS, 2003; MONATH e VASCONCELOS, 2015; DOUAM e PLOSS, 2018). No Brasil, desde 1942, não é descrito a presença do ciclo urbano. Em comparação, ainda são registrados surtos urbanos na África, predominantemente na Nigéria, Angola, República Democrática do Congo e Uganda (BARRET e HIGGS, 2007; CAVALCANTE e TAUIL, 2017).

O ciclo intermediário é responsável por criar uma ponte entre o ciclo urbano e o silvestre. Este tipo de transmissão geralmente ocorre em áreas com alguma atividade humana, como pequenos povoados, áreas de pastagem comunais e terras agrícolas, onde mosquitos de hábito semi-doméstico, passam a infectar tanto PNH quanto humanos. Os humanos, por sua vez, passam a fazer papel de hospedeiros

uma vez que residem ou trabalham nestas regiões (MUTEBI e BARRET, 2002; OPAS, 2019; CDC, 2019; WHO, 2019).

Figura 3 - Representação esquemática dos ciclos de transmissão do vírus da febre amarela

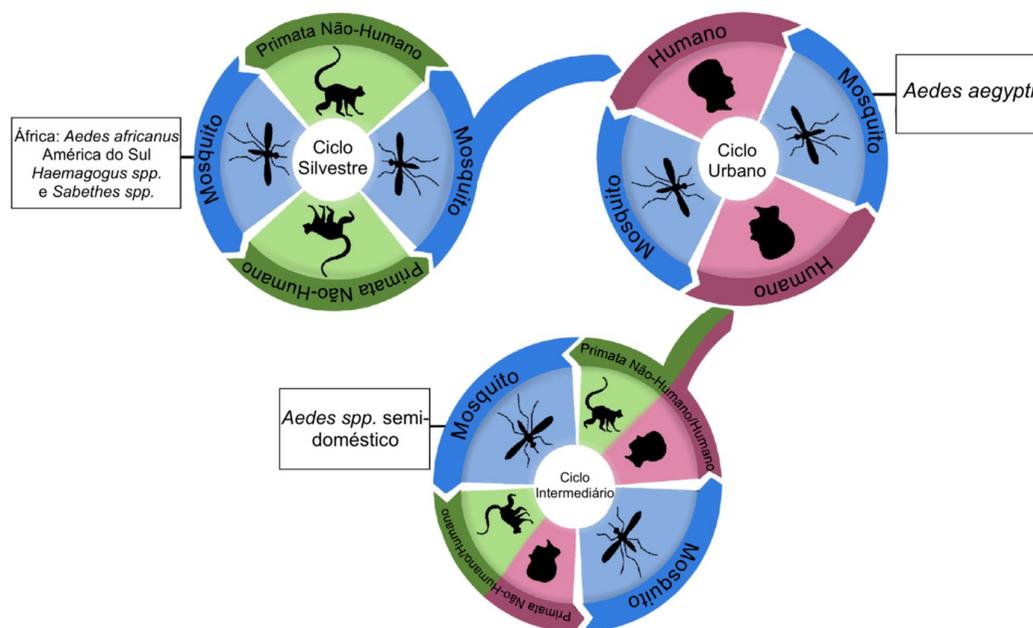


Figura 3 - Representação esquemática dos ciclos de transmissão do vírus da febre amarela. Os 3 ciclos de transmissão do vírus estão representados com a descrição dos principais gêneros de vetores envolvidos, bem como, os hospedeiros envolvidos. Fonte: CDC/NCEZID/DVBD. Transmission of Yellow Fever Virus, 2019, (Adaptado).

1.1.2 Epidemiologia

O perfil epidemiológico da doença varia entre os países das Américas e da África, refletindo diferentes níveis de intensidade de infecção. Na África, devido a constante circulação viral, os indivíduos acabam desenvolvendo imunidade natural ao vírus ao longo do tempo. Em vista disso, as crianças se tornam um grupo com grande suscetibilidade em adquirir a doença (STAPLES et al., 2010; WHO, 2013a; NORONHA, 2016). Nas regiões americanas endêmicas, por outro lado, a transmissão ocorre principalmente em indivíduos do sexo masculino com idade economicamente ativa (acima de 15 anos), em função da maior exposição a áreas e situações de risco, sobretudo em decorrência de atividades laborais, bem como,

entre os residentes dessas áreas (VASCONCELOS, 2002; BRASIL, 2017b). Outro grupo de risco está relacionado com populações não vacinadas que residem próximas a estas áreas com circulação do vírus da febre amarela, além de turistas, viajantes e migrantes que transitam sem estarem vacinados (BRASIL, 2017b; NETTO et al., 2017).

Durante os séculos XVIII e XIX, epidemias devastadoras de febre amarela urbana atingiram a Europa, a África e as Américas. Com a implementação de programas de erradicação de vetores e o aumento no saneamento básico, a forma urbana da doença foi erradicada na Europa e na América do Norte (MONATH, 2006; GARDNER e RYMAN, 2010). No entanto, a febre amarela silvestre permanece prevalente em regiões da África e Américas, Sul e Central, com cerca de 900 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco (GARDNER e RYMAN, 2010; MONATH e VASCONCELOS, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2019) mais de 200.000 casos são registrados em todo o mundo, atingindo taxas de mortalidade variando de 20-50% nas formas graves (WHO, 2019).

Apesar disso, vêm se identificando um risco potencial da reintrodução da forma urbana da doença, visto que grandes centros urbanos se encontram infestados pelo *Aedes aegypti*. Criando um cenário epidemiológico alarmante, na medida em que parte considerável da população dos centros urbanos se torna vulnerável à febre amarela se elevada cobertura vacinal não for atingida nestes locais (MONATH e VASCONCELOS, 2015; VASCONCELOS e MONATH, 2016; COUTO-LIMA et al., 2017). Segundo Vasconcelos e Monath, (2016), este possível cenário torna-se ainda mais preocupante uma vez que com o aumento do trânsito internacional e a disseminação do *A. aegypti*, induzindo aproximadamente 4 bilhões de pessoas a situações suscetíveis de contrair a doença (VASCONCELOS e MONATH, 2016).

No Brasil, a febre amarela é classicamente endêmica da região amazônica, sendo que na Região Extra-Amazônica são registrados ocasionalmente períodos epizooticos e/ou epidêmicos, caracterizando reemergências do vírus no país (RAMOS et al., 2019). A ocorrência é sazonal, sendo de maior incidência entre os meses de dezembro a maio, período em que as condições se tornam favoráveis para a transmissão, como alta densidade de vetores, temperaturas elevadas, altos níveis de pluviosidade (VASCONCELOS et al., 2001a; VASCONCELOS et al., 2001b; POSSAS et al., 2018; RAMOS et al., 2019). No entanto, existem registros de

transmissão em todos os meses do ano, caracterizando uma periodicidade irregular (RAMOS et al., 2019).

Nas duas últimas décadas, tem sido observado um crescimento do número de casos da doença e de períodos epidêmicos. Fatores como aumento na dispersão do vírus e consequente expansão de áreas de risco, baixa cobertura vacinal (diminuição da imunidade da população à infecção), desmatamento e urbanização, os movimentos populacionais e mudanças climáticas contribuem para este aumento acentuado do quadro geral da doença em todo o mundo. Torna-se, assim, essencial a detecção precoce da atividade viral para uma melhor mitigação dos danos nas populações suscetíveis (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014; BRASIL, 2015; AHMED e MIMSH, 2017; ORTIZ-MARTÍNEZ e PATIÑO-BARBOSA, 2017).

Periodicamente, a doença em sua forma silvestre se manifesta de forma epidêmica, caracterizando surtos extra-amazônicos com padrões e magnitudes irregulares (BRASIL, 2015). No entanto, segundo o Ministério da Saúde (2019), a observação de um padrão sazonal destes surtos, a partir da análise de uma série histórica definida, pode subsidiar a adoção da vigilância baseada na sazonalidade. Desta forma, o período de monitoramento da febre amarela inicia em julho e se encerra em junho do ano seguinte (BRASIL, 2019b).

Analisando a série histórica das últimas décadas no Brasil, podemos perceber pequenas variações entre os anos, com exceção do absurdo aumento no número de casos ocorrido nos anos de 2017 e 2018.

Figura 4 - Série histórica do número de casos humanos confirmados para febre amarela e a letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, Brasil, de 1980 a junho de 2018

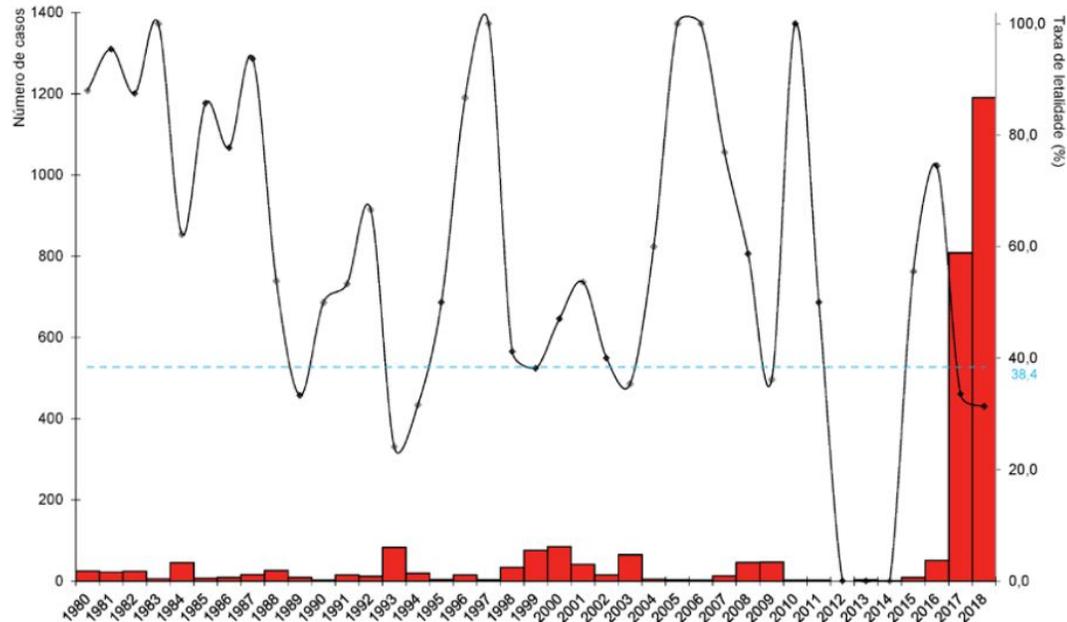


Figura 4 - Série histórica do número de casos humanos confirmados para febre amarela e a letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, Brasil, de 1980 a junho de 2018. As barras vermelhas representam o número de casos no decorrer dos anos e a linha preta a frequência de letalidade encontrada em cada ano. A linha azul tracejada indica a taxa média da letalidade de todos os anos demonstrados na figura. Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Febre Amarela. Informe N° 03/2018/2019: Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2018/2019. Brasília: Ministério da Saúde. 2018.

No período de 1980 a 2008, foram confirmados 726 casos humanos de febre amarela, com uma letalidade média de 52,8%. Contudo, em certos períodos a mesma taxa atingiu 100% (Figura 4). Todos os estados da região Norte registraram casos no período, mesmo que esporádicos, e essa região foi responsável por 35,8% das notificações do país, seguida pelas regiões Centro-Oeste (30,2%), Sudeste (18%), Nordeste (15%) e Sul (1%) (BRASIL, 2009a).

A partir de 2008, foi observada uma expansão da circulação viral no sentido leste e sul do país, notando-se a presença do vírus em áreas historicamente com baixa atividade de transmissão, atribuindo um caráter dinâmico à transmissão do

vírus da febre amarela (ARAÚJO et al., 2011; ROMANO et al., 2014). Em resposta a esse novo cenário epidemiológico houve um aumento nas ações de vigilância e monitoramento da febre amarela. Com isso, no período de 2008 e 2009, foram notificados 274 casos humanos suspeitos de febre amarela silvestre, com confirmação de 18,6% dos casos (51/274) e taxa de letalidade de 41,2%. A expansão da área de ocorrência observada no Rio Grande do Sul atingiu áreas que extrapolaram aquelas classificadas como de risco, caracterizando uma Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), baseado no Regulamento Sanitário Internacional, 2005. Ainda em 2009, foram confirmadas novas ESPIN nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso (BRASIL, 2009a; BRASIL, 2009b).

Durante o período de monitoramento, nos anos 2012 e 2013 foram notificados 279 casos humanos suspeitos de febre amarela em todo o país, mas nenhum caso foi confirmado fora da região considerada endêmica, ou seja, região extra-amazônica. No entanto, os estados com maior frequência de notificações foram São Paulo, Goiás, Paraná e Minas Gerais, possivelmente por terem sido áreas afetadas entre os anos de 2007 e 2009, durante a reemergência do vírus fora da região amazônica do Brasil (BRASIL, 2014a).

Entre os anos de 2014 e 2015, o padrão dos casos humanos de febre amarela se alterou. Sua maior incidência ocorreu em viajantes que realizavam atividades de lazer na região Centro-Oeste do país, uma vez que a maior parte dos casos notificados foram nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul (BRASIL, 2015).

Nos últimos anos, o Brasil registrou uma disseminação importante da doença, principalmente na Sudeste, onde a maior parte da população não era imunizada contra a doença, resultando na maior epidemia das últimas décadas (FREIRE et al., 2018). Em 2016, os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro apresentaram os maiores números de casos confirmados, sendo 777 casos humanos e 261 óbitos (BRASIL, 2017c; BRASIL, 2018). O surto que se iniciou em 2016, se manteve nos anos de 2017 e 2018 quando foram registrados 1.376 casos humanos e 483 óbitos, além de 864 epizootias por febre amarela no país (BRASIL, 2019b).

Atualmente, de acordo com o período de monitoramento 2018/2019, foram notificados 682 casos humanos suspeitos de febre amarela, dos quais 554 foram

descartados, 116 permanecem em investigação e 12 foram confirmados, sendo que 5 evoluíram para óbito. A prevalência na notificação dos casos reflete a dos últimos anos, sendo maior na região Sudeste. Contudo, o estado de São Paulo registrou o maior número de notificações e casos confirmados (BRASIL, 2019b).

Devido ao caráter dinâmico que o cenário epidemiológico da febre amarela vem apresentado, tornam-se necessárias avaliações periódicas das áreas de risco para melhor direcionamento dos recursos e aplicação das medidas de prevenção e controle (BRASIL, 2009; ROMANO et al, 2011; BRASIL, 2015).

1.1.3 Controle e prevenção

Não existe tratamento específico para a febre amarela, contudo um manejo adequado do tratamento dos sintomas e das ocorrências induz melhora nas taxas de sobrevivência. Logo, o tratamento se dá basicamente por terapia de suporte, com cuidadosa assistência ao paciente que, sob hospitalização, deve permanecer em repouso, com reposição de líquidos e das perdas sanguíneas, quando indicado, com cuidado acentuado no tratamento de falência do fígado e rins (ROLLINS et al., 2017).

A vacinação é a principal estratégia de controle e prevenção disponível. A OMS certifica o uso de duas vacinas constituídas de vírus vivo atenuado, provindas da amostra 17D: 17D-204 e 17DD, consideradas altamente imunogênicas e seguras. Para controle eficiente da doença em áreas de risco, segundo a OMS deve-se atingir uma cobertura vacinal acima de 80% (WHO, 2019), enquanto a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) recomenda para os países das Américas acometidas pela doença, uma cobertura vacinal de ao menos 95% (OPAS, 2019).

No Brasil, a expansão dos casos de febre amarela para além da Região Amazônica a partir de 2008 suscitou a necessidade da adoção de novas estratégias de vigilância, prevenção e controle. Logo, áreas de risco e de recomendação para vacinação passaram a ser avaliadas e definidas periodicamente por um Comitê de Especialistas em Febre Amarela, do Ministério da Saúde. Para isso, são avaliados períodos de transmissão anteriores àquele vigente, e redefinidas as áreas de recomendação de vacina à população residente, bem como para visitantes. Dessa maneira, as áreas de risco vêm sendo classificadas como Área com Recomendação

de Vacina ou Área sem Recomendação de Vacina, com adoção de estratégias distintas para o controle em cada uma dessas áreas (Quadro 1) (BRASIL, 2011).

Quadro 1 – Estratégias de controle das áreas de recomendação da vacina contra febre amarela

| | |
|---|---|
| <p>Áreas com recomendação de vacina (ACRV)</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Vacinar 100% da população a partir dos 9 meses de idade (residentes e visitantes). - Monitorar coberturas vacinais em todos os municípios. - Notificar e investigar eventos adversos pós-vacinais. - Notificar e investigar, em menos de 24 horas, casos humanos suspeitos e epizootias de primatas. - Manter demais ações para captação precoce e tratamento dos casos de febre amarela. |
| <p>Áreas sem recomendação de vacina (ASRV)</p> | <ul style="list-style-type: none"> - Disponibilizar e ampliar a vacinação para viajantes com destino a ACRV. - Desenvolver as estratégias de detecção precoce da circulação viral. - Ampliar a vigilância de casos humanos suspeitos. - Ampliar capacidade de resposta do serviço. |

Quadro 1 – Estratégias de controle das áreas de recomendação da vacina contra febre amarela. Fonte: Adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Nota Técnica - Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle. Epidemiol. Serv. Saúde, 20(1):101-106, 2011.

Até 2012 todos os países das Américas com as áreas enzoóticas (presença de infecção de PNH) haviam incorporado a vacina nos programas nacionais de imunização, sendo que Argentina, Brasil e Panamá não recomendaram a vacinação em todo território nacional, limitando-a somente em áreas de risco potencial (WHO, 2015; OLIVEIRA e CUNHA, 2015), também denominadas, no Brasil como, áreas com recomendação de vacina.

Em julho de 2013, a OMS realizou uma revisão do documento referente a imunização contra a febre amarela, vigente desde 2003. Os principais pontos

analisados foram acerca da necessidade de uma dose de reforço da vacina antiamarílica após 10 anos e a segurança da vacina em populações com particularidades em seus sistemas imunes (indivíduos acima de 60 anos, pessoas que convivem com o HIV, pessoas que apresentam algum tipo de imunossupressão, grávidas e nutrizes). As conclusões alcançadas se concentram na atualização do uso de uma dose única que garante proteção por toda a vida (BRASIL, 2014b). Essa alteração foi atualizada no Regulamento Sanitário Internacional, em 2014 (BRASIL, 2014c; WHO, 2014). Mas apenas em 2016 essa nova regulamentação foi implementada (WHO, 2016a).

No Brasil, desde 1997 o Ministério da Saúde vem ampliando as áreas com recomendação de vacinação, devido ao caráter dinâmico que a doença passou a apresentar, com aumento dos casos fora da região Amazônica, e nos últimos anos, a presença de surtos em áreas historicamente com baixa ou sem circulação do vírus da febre amarela (Figura 5).

Figura 5 – Série histórica de mapas com áreas de recomendação da vacina contra febre amarela

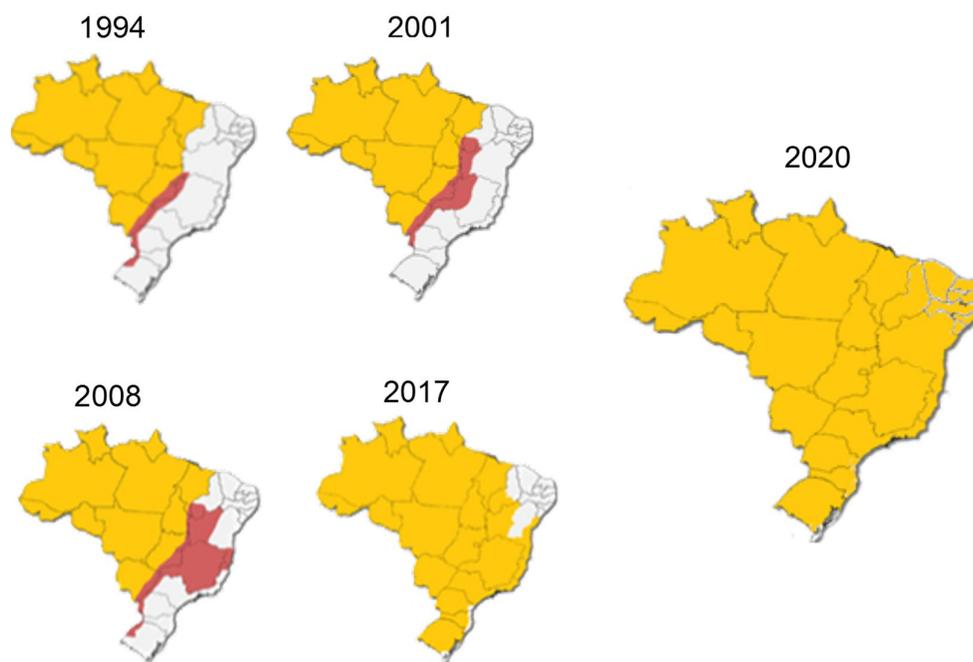


Figura 5 – Série histórica de mapas com áreas de recomendação da vacina contra febre amarela. As regiões destacadas em laranja representam as áreas de recomendação da vacina contra febre

amarela. As destacadas em vermelho representam áreas de transição para a transmissão do vírus da febre amarela. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em março de 2018, foi acordada a recomendação da vacina em todo o território nacional de forma gradativa. De acordo com o Ministério da Saúde esta é uma medida preventiva e tem por objetivo antecipar a proteção de toda a população brasileira contra a doença caso o cenário epidemiológico piore. Até o momento do acordo firmado, alguns estados do Nordeste e parte das regiões Sul e Sudeste não faziam parte das ACRV. Com isso, municípios dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia utilizaram o fracionamento da dose padrão da vacina, como uma estratégia utilizada para localidades com a confirmação da circulação viral e com grande contingente populacional (BRASIL, 2018; MENEZES MARTINS et al., 2018).

Além da vacinação, diversas estratégias vêm sendo implementadas para o combate da febre amarela. Dentre elas, destacam-se o combate aos vetores e uso de proteção individual, por exemplo, como repelentes e mosquiteiros para aqueles residentes e viajantes para áreas silvestres com circulação viral. No entanto, o combate aos vetores da febre amarela silvestre é extremamente inviável, restando o controle do principal vetor da febre amarela urbana, o *A. Aegypti*, que juntamente com a vacinação, tornam-se os únicos meios de se impedir a reurbanização da febre amarela (VASCONCELOS, 2002).

A OMS, o Fundo das Nações Unidas para a Infância (*United Nations Children's Fund* – UNICEF, em inglês) e o GAVI (*Global Alliance for Vaccines and Immunisation*, em inglês) criaram o programa “Eliminação da Epidemia de Febre Amarela” (*Eliminate Yellow Fever Epidemics Strategy* – EYE, em inglês), com o intuito principal de responder a ameaça de surtos urbanos com uma possível propagação internacional, o programa postula, principalmente, 2 formas de controle da doença além da vacinação: vigilância e controle vetorial e vigilância da doença e capacidade laboratorial. O objetivo é a melhoria no diagnóstico da doença, tornando-o mais rápido e precoce, para que as medidas de controle possam ser aplicadas de forma mais eficiente (WHO, 2018).

1.2 Vacina da febre amarela

1.2.1 Breve histórico

As inúmeras perdas do Exército norte-americano, causadas pela febre amarela, durante a Guerra Hispano-Americana (1898), resultaram na criação da Comissão Reed Febre Amarela, com o intuito de identificar os mecanismos por trás da transmissão da doença. No último ano do século XIX, a Comissão liderada por Walter Reed, utilizando da hipótese de médico cubano Carlos Finlay, identificou a capacidade vetorial de mosquitos em transmitir a febre amarela. Esta informação levou à erradicação da forma urbana da doença nos Estados Unidos e alguns países da América do Sul e Central, devido a potentes programas de controle de vetores, entre os anos de 1900 e 1920 (CLEMENTS e HARBACH, 2017).

Em 1915, a Comissão da Febre Amarela do Instituto Rockefeller intensificou a pesquisa para identificar a causa da doença. Em 1927, o agente etiológico da febre amarela foi isolado, através de passagens seriadas em macaco rhesus (*Macaca mulatta*) utilizando o soro de um paciente gânes, de nome Asibi. Anos depois, em 1936, Max Theiler e Hugh H. Smith submeteram o vírus isolado do paciente Asibi a processos de atenuações, por meio de passagens em macacos rhesus, com passagens intermitentes em *A. Aegypti*. Posteriormente, o vírus foi propagado em tecido embrionário de camundongos e, por fim, em cultura de tecidos de embrião de galinha. Após a manutenção da cepa neste meio de cultura, a amostra foi isolada, em 1937, e denominada 17D (MONATH, 1991; COSTA et al., 2011).

Finalmente, em 1937, foi criada e registrada a primeira vacina contra a febre amarela, com o vírus vivo e atenuado, utilizando a cepa 17D, mas subculturas ainda foram realizadas e testadas com o intuito de atenuar o vicerotropismo e o neurotropismo induzidos pelo vírus (THEILER e SMITH, 1937a; COSTA et al., 2011).

A vacina 17D foi testada em macacos rhesus, induzindo uma infecção leve e generalizada. Em seguida, uma coorte de indivíduos, sem história prévia de imunização nem contato com o vírus da febre amarela, foi imunizada via subcutânea com a mesma amostra 17D. Duas semanas depois, foi possível detectar anticorpos

neutralizantes no soro da maioria dos indivíduos, e nenhuma manifestação grave foi observada (THEILER e SMITH, 1937a; THEILER e SMITH, 1937b).

Várias linhagens derivadas da cepa 17D foram testadas para alcançar um nível de atenuação que mantivesse a imunogenicidade. No entanto, foram isoladas duas subcepas, de uma única ancestral, que demonstraram bom desempenho e são utilizadas para a produção de vacinas: a 17DD na passagem 195 e a 17D-204 derivada da passagem 204 da cepa 17D original (BARRET et al., 2007).

Atualmente, os laboratórios produtores da vacina contra a febre amarela utilizam a cepa 17D e a 17DD em diferentes passagens.

No Brasil, o Instituto de Imunobiológicos de Bio-Manguinhos (FIOCRUZ) produz a vacina 17DD, sendo o maior fabricante do mundo. Em situações de rotina o Instituto produz cerca de 4 milhões de doses mensais, no entanto, em emergências, onde ocorre o aumento da demanda da vacina, a produção do imunobiológico chega a 6 milhões. No entanto, a capacidade total de produção do Instituto é de 9 milhões de doses por mês, totalizando 108 milhões de doses anuais (VALVERDE, 2017). Em 2018, o Ministério da Saúde juntamente com Bio-Manguinhos acordou uma parceria com a Libbs Farmacêutica (São Paulo) para a transferência de tecnologia permitindo assim, que a empresa privada passe a realizar a linha final de produção da vacina. A etapa final consiste na liofilização (preparação do produto), envase e embalagem das doses. Com este acordo a Fiocruz poderá aumentar a capacidade de produção em 4 milhões de doses por mês (LIBBS FARMACÊUTICA, 2018).

Além de BioManguinhos, os outros centros produtores da vacina utilizam diferentes subcepas da 17D. Na Rússia, o Centro Federal Chumakov (*Chumakov Federal Scientific Centre for Research and Development of Immune-and-Biological Products*) utiliza a 17D-213; enquanto na França (*Sanofi Pasteur*), Senegal (*Instituto Pasteur*) produz-se a vacina utilizando a subamostra original, 17D-204. Estes quatro laboratórios são pré-qualificados internacionalmente pela Organização Mundial da Saúde, por conseguinte, as vacinas produzidas são utilizadas em campanhas de vacinação (FERGUSON et al., 2010; MENEZES MARTINS et al., 2018). Outros países produzem vacinas para uso local, como Estados Unidos da América e Colômbia (MONATH, 2005) no entanto não possuem a certificação da OMS.

Algumas subcepas vacinais, providas de diferentes passagens, acabaram se tornando pouco imunogênicas e outras com maior neurovirulência, levando à necessidade de padronização da produção. Uma opção para essa padronização

seria controlar o número de passagens para a produção da vacina, este sistema é denominado como sistema lote-semente, e vem sendo utilizado/padronizado desde 1945 (MONATH et al., 2002; MONATH, 2005). De forma resumida, lotes originais do vírus atenuado são submetidos a uma nova passagem em ovos embrionados de galinha, dando origem a lotes secundários que servirão de fonte para a produção do imunizante. Este sistema se torna eficiente a ponto de diminuir o risco de mutações no vírus vacinal (FREESTONE, 1994).

O Instituto de Imunobiológicos de Bio-Manguinhos (FIOCRUZ) vem sendo, desde 1974, um importante produtor da vacina antiamarílica, utilizando a subamostra 17DD. Ele chega a fabricar aproximadamente 80% da produção mundial suprimindo não somente às necessidades nacionais, como também às de outros países suscetíveis (BENCHIMOL, 2001).

A concentração viral por dose da vacina antiamarílica, para a aplicação por via subcutânea, não deve ser menor que 1.000 MLD₅₀ (*Medium Mouse Lethal Dose* - quantidade de vírus capaz de matar 50% dos camundongos testados). No entanto, para manter essa concentração nas vacinas produzidas são necessários testes periódicos com vacinas de referência. Usualmente, a MLD₅₀ é expressa em escala logarítmica – \log_{10} MLD₅₀, a dose mínima padronizada é de 3 \log_{10} MLD₅₀. Devido a uma grande variabilidade na expressão desta concentração, foi-se padronizado o uso de 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. A concentração indicada em PFU é de aproximadamente 5000 PFU.

Para minimizar a divergências entre os diferentes produtores da vacina, um estudo internacional colaborativo foi realizado para definir um candidato padrão internacional para a vacina da febre amarela, visto que o uso de MLD₅₀ se mostrou variável entre os laboratórios participantes. A concentração estabelecida foi de unidades internacionais (UI) por dose. Atualmente, a OMS recomenda 3 \log_{10} UI (FERGUSON e HEATH, 2004; FERGUSON et al., 2010).

1.2.2 Esquema Vacinal no Brasil

No Brasil, a vacina antiamarílica encontra-se atualmente no calendário nacional de vacinação, e, de acordo com a Portaria nº 597, de 08 de abril de 2004, é

de caráter obrigatório, devendo os serviços público de saúde ou médicos em exercício, fornecerem o comprovante de vacinação (BRASIL, 2004).

A vacina deve ser administrada por via subcutânea com volume de 0,5mL, em dose única. O esquema vacinal consiste em uma única dose a partir dos 9 meses de idade em residentes e viajantes para áreas endêmicas, conforme recomendação do Ministério da Saúde do Brasil. Algumas populações necessitam de uma avaliação criteriosa e individualizada do risco-benefício para a recomendação da vacina, são elas: pessoas acima de 60 anos, gestantes e nutrizes, pessoas com alguma imunodeficiência, doadores de sangue ou órgãos, dentre outros. A vacina é contraindicada para crianças menores de 6 meses de idade, pessoas com histórico de anafilaxia comprovada e/ou eventos adversos graves em doses anteriores, pacientes com imunossupressão grave, pacientes transplantados, entre outros (BRASIL, 2017a).

O Programa Nacional de Imunizações sofre constantes alterações através de análises de trabalhos publicados vindos de demandas induzidas pelo Ministério da Saúde. Essas mudanças auxiliaram muito na ampliação da cobertura vacinal de todos os imunológicos do calendário. A partir de 2020, o Sistema Único de Saúde (MS) passará a oferecer uma dose de reforço para crianças de 4 anos e ampliará a vacinação para os 1.101 municípios dos estados da região Nordeste que não faziam parte da área de recomendação da vacina. Dessa forma todo o país passará a contar com a vacina contra febre amarela na rotina dos serviços de saúde (BRASIL, 2019c).

1.2.3 Segurança e reatogenicidade

As vacinas contra febre amarela são geralmente consideradas seguras. Após a introdução do sistema de lote-semente e padronização dos procedimentos de produção, houve um aumento significativo na segurança dessas vacinas. Apesar disso, eventos adversos associados à vacinação podem ocorrer. Em sua maioria são eventos adversos leves (dor local, mal-estar, cefaleia, dores musculares) ocorrem em cerca de 20% dos indivíduos vacinados (GARDNER e RYMAN, 2010, GERSHMAN e STAPLES, 2017). Essas reações duram em média de 1 a 2 dias e são, na maioria das vezes, brandas e com evolução favorável espontânea.

De maneira bem menos frequente, podem ocorrer também eventos adversos mais graves, que são classificados como reações de hipersensibilidade, doença neurológica associada a vacina da febre amarela (DNA-VFA) e a doença viscerotrópica associada a vacina da febre amarela (DVA-VFA).

As reações de hipersensibilidade são raras, podendo ocorrer manifestações alérgicas imediatas com erupção cutânea e urticária (um caso para 130 mil a 250 mil doses distribuídas). Também é relatada a presença de anafilaxia (0,8 por 100 mil doses distribuídas). Essas reações ocorrem geralmente em pessoas que possuem alergia a proteínas de ovo, no entanto elas podem ser desencadeadas por qualquer um dos componentes da vacina (BRASIL, 2008; BRASIL, 2014c).

A DNA-VFA é um evento raro, e de acordo com o Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação (2014), do Ministério da Saúde, as complicações neurológicas estão diretamente relacionadas com a invasão do vírus vacinal no sistema nervoso central ou pelas reações inflamatórias e desmielinizantes, representadas por manifestações autoimunes. Estes eventos geralmente ocorrem entre 3-28 dias após a vacinação, sendo quase sempre autolimitado (MONATH et al., 2012; BRASIL, 2014c; CHEN e HOCHBERG, 2019). O principal quadro observado é de meningoencefalite. Casos de neuromielite óptica, síndrome de Guillain-Barré e encefalomielite disseminada aguda também foram descritos e, presumivelmente, têm etiologia autoimune. Todos os eventos de DNA-VFA foram registrados em indivíduos primovacinados, sendo raramente fatal e dificilmente ocorrem sequelas neurológicas (GERSHMAN e STAPLES, 2017). A prevalência em crianças pequenas diminuiu consideravelmente desde a restrição da administração da vacina em crianças com menos de nove meses de idade (CDC, 2002). A DNA-VFA vem sendo observada em crianças e adultos (CDC, 2002; KENGSAKUL et al., 2002; KITCHENER, 2004; GERSHMAN e STAPLES, 2017).

Pesquisas realizadas nos Estados Unidos da América apontam, uma incidência de DNA-VFA em 0,4 por 100.000 doses aplicadas, podendo ser 6x maior entre indivíduos com idade acima de 60 anos (LINDSEY et al., 2008). Na África Central, entre os anos de 2007 e 2010, cerca de 38 milhões de doses foram aplicadas, contudo, apenas 5 casos suspeitos de DNA-VFA foram notificados durante a farmacovigilância realizada na época (BREUGELMANS et al., 2013), enfatizando a segurança da vacina contra a febre amarela.

Além da DNA-VFA, a DVA-VFA é um evento adverso temporalmente associado a vacinação considerado de extrema gravidade com maior letalidade. É uma complicação, geralmente aguda, similar à doença do tipo selvagem, na qual o vírus vacinal dissemina-se para diversos órgãos, podendo levar à falência de múltiplos órgãos, choque, derrame pleural e abdominal e morte. A viremia ocorre normalmente de 3-7 dias após a primovacinação, não se repetindo nas doses subsequentes (reforço) (HAYES, 2007; MONATH et al., 2012; BRASIL, 2014c).

No Brasil, de uma forma geral, tem sido observado um aumento no risco da ocorrência de eventos adversos associados à vacinação anti-amarela em áreas onde não havia recomendação da vacinação de rotina (BRASIL, 2014c). No entanto, estudos demonstram que não existem fatores relacionados com o vírus vacinal que favoreceriam a maior incidência de eventos adversos. De forma adicional, um estudo realizado por um comitê internacional de especialistas, solicitado pelo Ministério da Saúde do Brasil, não encontrou mutações significativas no vírus vacinal e concluiu, que estes eventos são considerados raros, sendo determinados, por fatores individuais (GALLER et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2001c) embora ainda desconhecidos.

1.2.4 Eficácia e imunogenicidade

As vacinas disponíveis contra a febre amarela induzem altos níveis de proteção, por anticorpos neutralizantes, em aproximadamente 95 a 99% dos adultos, de 10 a 30 dias após a vacinação (MONATH, 2001; COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACCINES, 2014; CAMPI-AZEVEDO et al., 2016; COSTA-PEREIRA et al., 2018; FERREIRA et al., 2018; COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACCINES, 2019). A resposta primária à vacina 17D/17DD por anticorpos neutralizantes é rápida (detectável 7 dias após a vacinação) e altamente específica. De acordo com o CDC, um total de 23 falhas vacinais foram identificadas após a administração de mais de 540 milhões de doses da vacina (CDC, 2015; STAPLES et al., 2015).

Um estudo de imunogenicidade conduzido em adultos no Brasil, comparando as vacinas de febre amarela 17D-204 e 17DD, demonstrou uma equivalência entre as vacinas, com proporção de soroconversão mínima de 98% em indivíduos

soronegativos (CAMACHO et al., 2004). No entanto, evidências demonstram que a eficácia vacinal é menor em lactentes do que em crianças e adultos. Um estudo realizado pelo Grupo Colaborativo do Programa Nacional de Imunizações, em 2003, demonstrou menores taxas de soroconversão em crianças do que em adultos. O grupo com idade de 10 anos ou mais teve 97% de soroconversão, crianças de 2 a 9 anos (94%), crianças de 12 a 23 meses (88%), 9-11 meses (72%) e no grupo de 6-8 meses (82%) (GRUPO COLABORATIVO DO PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES PARA O ESTUDO DA SOROCONVERSÃO PELA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA, 2003). Em estudo recente, Campi-Azevedo e colaboradores (2019), demonstraram que após 4 anos de primovacinação as taxas de soroconversão em crianças primovacinadas aos 9 meses de idade, caem para níveis alarmantes (abaixo de 60%) (CAMPI-AZEVEDO et al., 2019). Perfis de baixa efetividade da vacina da febre amarela são observados para outras populações com alguma supressão imunológica (ROUKENS et al., 2011; GOTUZZO et al., 2013; BARTE et al., 2014; COLIN DE VERDIERE et al., 2018).

Alguns estudos demonstram que a imunidade induzida pela vacina da febre amarela, em adultos primovacinados, é duradoura para toda a vida (POLAND et al., 1981; NIEDRIG et al., 1999; WIETEN et al., 2016). De forma adicional a OMS descontinuou a recomendação da dose de reforço após 10 anos. No entanto, um trabalho desenvolvido pelo Grupo Colaborativo para Estudos em Febre Amarela, em 2014, demonstrou uma queda significativa nas taxas de soroproteção após 4 anos de vacinação, tendo um percentual de aproximadamente 24% de indivíduos desprotegidos após 10-11 anos após a primovacinação (COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACINES, 2014). Outros estudos vêm demonstrando essa queda progressiva de acordo com o tempo pós-primovacinação (CAMPI-AZEVEDO et al., 2016; COSTA-PEREIRA et al., 2018; CAMPI-AZEVEDO et al., 2019; KAREKO et al., 2020).

1.3 Resposta imune à vacina antiamarilica

1.3.1 Resposta imune humoral

As vacinas derivadas da cepa 17D induzem resposta imune humoral considerada rápida e específica. Após a primovacinação, uma breve viremia (2 a 3 dias) e em níveis baixos (<200 PFU/mL) é detectada em aproximadamente 50% dos indivíduos vacinados, com rápida resolução (BARRET e TEUWEN, 2009).

Posteriormente a viremia, anticorpos IgM podem ser detectados entre o 3º e 7º dia, caracterizando uma resposta primária à vacina, com pico em duas semanas após a vacinação. Os anticorpos diminuem após essa fase, permanecendo detectáveis por até 3 meses (MONATH, 1971; FERREIRA et al., 2018). No entanto, tem sido demonstrada a detecção de IgM 3-4 anos após a vacinação (GIBNEY et al., 2012). A magnitude da resposta de IgM é significativamente maior nos casos de infecção primária em relação aos casos com exposição prévia a flavivírus, nos quais a proporção de IgM para IgG se torna menor (MONATH, 2005; MONATH et al., 2013).

Posteriormente à resposta de IgM, anticorpos neutralizantes, em sua maioria IgG, passam a ser detectados. Sua principal função é se ligar à partícula viral impedindo que esta infecte as células-alvo. Eles são considerados o principal mecanismo de proteção específica para a febre amarela, sendo direcionados a uma gama de epítomos complexos encontrados na superfície do vírus da febre amarela (PIERSON et al., 2008; VRATSKIKH et al., 2013; FERREIRA et al., 2018). São persistentes por anos e acredita-se que proporcionam proteção contra a doença caso o indivíduo venha a ser exposto ao agente causador (GOTUZZO et al., 2013). Uma outra classe de anticorpos com função biológica no controle da doença são os inibidores de hemaglutinação, possuem pico de detecção entre o primeiro e o segundo mês após a vacinação, mas apresentam níveis baixíssimos após 6 meses (MONATH et al., 2013).

De acordo com Pierson e colaboradores (2008) os anticorpos conferem proteção através de vários mecanismos, como: lise mediada por complemento de células infectadas, citotoxicidade direta, neutralização do vírus, inibição da fusão viral, entre outros (PIERSON et al., 2008).

Vários testes sorológicos estão disponíveis para mensurar anticorpos neutralizantes, dentre eles: ELISA, teste de imunofluorescência indireta, teste de inibição da hemaglutinação. No entanto, o PRNT (Plaque Reduction Neutralization Test, do inglês) é o teste padrão ouro para detecção de anticorpos neutralizantes,

sendo considerado o mais sensível e específico para avaliar a resposta vacinal antiamarílica (NIEDRIG et al., 1999; MONATH e VSCONCELOS, 2015).

1.3.2 Resposta imune celular

Embora estudos apontem a participação de anticorpos neutralizantes como principal método de ação por conceder imunidade vacinal (ROUKENS et al., 2018; SIMÕES et al., 2012; VRATSKIKH et al., 2013;), não há evidências diretas para o papel exclusivo destes, tendo um consenso em diversos estudos da participação de diversos tipos de células na proteção e manutenção da resposta vacinal (AKONDY et al., 2009; CAMPI-AZEVEDO et al., 2012; HOU et al., 2017; QUEREC et al., 2003; QUEREC e PULENDRAN, 2007).

Vem sido demonstrado que a imunidade inata é responsável pelo controle inicial da infecção pelo vírus da febre amarela (QUEREC e PULENDRAN, 2007; MARTINS et al., 2008; HOU et al., 2017). Devido a capacidade do vírus amarelo de se replicar em células dendríticas e não levar a apoptose da célula, epítomos endógenos e recombinantes acabam sendo expressos (BARBA-SPAETH et al., 2005) e estimulam diferentes tipos de receptores “*Toll-like*”, como, TLR 2, 3, 7, 8 e 9 (QUEREC et al., 2006; QUEREC e PULENDRAN, 2007). Esse fenômeno, resulta em um perfil de produção de quimiocinas (CXCL10) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α), induzindo uma resposta de interferon do tipo I culminando na maturação e ativação de células dendríticas mieloides e plasmocitóides (NEVES et al., 2009; PULENDRAN et al., 2013) bem como, desempenhando um papel importante na produção de uma resposta imune adaptativa eficiente.

Martins e colaboradores (2008), avaliaram diferentes fenótipos de células da imunidade inata em adultos submetidos a primovacinação pela vacina 17DD. Foram observados perfis de ativação de eosinófilos com aumento da expressão das moléculas CD28 e HLA-DR e de neutrófilos com o aumento de CD23 e CD28. Também foi demonstrado aumento na frequência de monócitos ativados (CD14⁺CD16^{high}), bem como, da subpopulação de monócitos pro-inflamatórios (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺) (MARTINS et al., 2008). Alguns estudos apontam as células NK como fundamentais no controle da viremia durante os eventos iniciais da infecção, devido a capacidade de limitar a disseminação de patógenos e vírus, bem

como, desencadear uma resposta imune adaptativa a antígenos específicos durante o período pós-vacinal (NEVES et al., 2009; DELVES e ROITT, 2000).

A vacina antiamarílica induz ativação de linfócitos gama-delta ($\gamma\delta$). Eles são as primeiras células a produzir IFN- γ , que são posteriormente auxiliados pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Essa produção inicial de IFN- γ auxilia a maturação de células dendríticas e na polarização de linfócitos CD4⁺ para uma resposta Th1 (NEVES et al., 2010; NEVES et al., 2013).

De forma geral, a ativação do eixo da imunidade inata é um *checkpoint* crítico para uma ativação eficiente da resposta de células T, principalmente pela apresentação aprimorada de antígenos por células dendríticas e células NK (BARBA-SPAETH et al., 2005; RAVINDRAN et al., 2014; MARQUARDT et al., 2015).

Simultaneamente à viremia, o percentual de linfócitos T CD8⁺ aumenta significativamente com pico no 5º dia após a primovacinação (AHMED e AKONDY, 2011; AKONDY et al., 2015). No 15º dia após a vacinação ocorre aumento do número de linfócitos T CD8⁺ expressando HLA-DR e CD38, importantes moléculas de superfície no processo de diferenciação de células efetoras (MARTINS et al., 2007). No 30º dia após a vacinação, ocorre a perda do fenótipo efetor e as células passam a exercer diferentes papéis de memória (baseando na expressão de CD45RA e CCR7). Estudos vêm demonstrando que esta transição ocorre entre o dia 15 até o 90º dia após a vacinação (BANNARD et al., 2009; BLOM et al., 2013; AKONDY et al., 2015).

A memória imunológica é a base da proteção induzida pela vacina e as células de memória T CD8⁺ constituem um importante componente celular dessa imunidade. Vem sendo descrito que, em infecções virais, as células T CD8⁺ de memória ao passarem por expansão clonal antígeno-dirigida induzem uma resposta antiviral dinâmica, inicialmente, caracterizada pela morte do patógeno através de moléculas citotóxicas e citocinas efetoras e, posteriormente, pela presença de uma pequena população de células de memória, as quais podem ser rapidamente recrutados para neutralizar infecções subsequentes. Diante disso, pode-se concluir que os linfócitos T CD8⁺ desempenham diversos papéis frente a vacinação contra a febre amarela, como funções efetoras que se mantêm durante anos, de citotoxicidade direta, degranulação e secreção de citocinas antivirais (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e CCL4) (AKONDY et al., 2009; FUERTES MARRACO et al., 2015).

De forma antagônica aos picos de linfócitos T CD8⁺, os linfócitos T CD4⁺ decaem durante o pico da viremia vacinal. No entanto, ocorre um aumento significativo desses linfócitos quando a infecção está controlada (REINHARDT et al., 1998; KOHLER et al., 2012). Como um reflexo da ativação diferenciada de TLR e da formação de microambientes distintos, a polarização de células CD4⁺ se modifica em respostas Th1 e/ou Th2 (GAUCHER et al., 2008; SANTOS et al., 2008), demonstrando múltiplas funções após a vacinação (KOHLER et al., 2012; JAMES et al., 2013). Frente à vacinação antiamarílica, ocorre uma predominância na produção e secreção de IFN, no entanto Campi-Azevedo e colaboradores (2016) demonstraram uma mudança no perfil de produção de citocinas dessas células, com predomínio da produção de IL-10 por CD4⁺, em indivíduos com 10-11 anos de primovacinação. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que nesses indivíduos com mais de 10 anos de primovacinação, perfis de memória efetora de CD4⁺ e CD8⁺, bem como, memória clássica de linfócitos B caem a níveis preocupantes (CAMPI-AZEVEDO et al., 2016).

De forma geral, a resposta frente a vacina antiamarílica se inicia com uma ativação da imunidade celular, de ambos os componentes, inata e adaptativa, antes do início da produção de anticorpos neutralizantes, caracterizando uma resposta imune integrada, ampla, polifuncional e persistente (GAUCHER et al., 2008; AKONDT et al., 2009).

Uma proporção inversa, entre linfócitos T e B, tende a ocorrer por volta de 7 dias após a vacinação, quando os níveis de linfócitos B (CD19⁺) caem, o que provavelmente, leva a um aumento de linfócitos T. No entanto, após duas semanas a população de linfócitos B aumenta, o que pode também caracterizar uma maior produção de anticorpos neutralizantes, uma vez que fenótipos de ativação (CD19⁺CD69⁺) passam a estar mais presentes, bem como, um aumento na expressão de IL-10R, importante citocina que favorece a proliferação e diferenciação de linfócitos B (MARTINS et al., 2007; CAMPI-AZEVEDO et al., 2012; KOHLER et al., 2012; FERREIRA et al., 2018).

1.3.3 Perfil funcional de citocinas e quimiocinas

Um balanço entre citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e reguladoras deve existir para que ocorra o controle da infecção do vírus vacinal e para que a

resposta induzida pela vacina seja eficiente e segura (QUEREC et al., 2006; SILVA et al., 2011; LUIZA-SILVA et al., 2011). No momento em que ocorre a viremia, de 5 a 7 dias após a vacinação, observa-se um aumento de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-2 e uma queda de citocinas reguladoras, principalmente a IL-10. Este microambiente favorece o desenvolvimento e maturação de células apresentadoras de antígenos profissionais, bem como, aumenta a expressão de MHC na superfície dessas células (CAMPI-AZEVEDO et al., 2012; CAMPI-AZEVEDO et al., 2014). Após o controle da infecção, citocinas como IL-4 e IL-5 tendem a aumentar com picos detectados no dia 30 pós vacinação (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014).

A vacinação antiamarílica, assim como a infecção, perpetua um repertório específico de células T de memória que se mantêm em proliferação (homeostática) induzida principalmente por citocinas pró-inflamatórias, e ao mesmo tempo, modulada por citocinas reguladoras (RAVINDRAN et al., 2014). Essa afirmação corrobora com os achados de Campi-Azevedo e colaboradores (2016), que demonstraram uma diminuição dos níveis de TNF- α e IFN- γ produzidas por linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, bem como o aumento dos níveis de linfócitos TCD4⁺IL-10⁺ ao longo do tempo pós vacinação (CAMPI-AZEVEDO et al., 2016).

Outra resposta proeminente frente a infecção é a secreção de quimiocinas que tem como principal papel atrair leucócitos para o sítio de infecção, como CXCL10 e CCL5 (MELCHJORSEN et al., 2003). Em um estudo para detectar diferenças entre as respostas imunes induzidas pela infecção do vírus vacinal e do vírus selvagem, Fernandez-Garcia e colaboradores (2016) demonstraram um aumento de IFN- β , IL-29, ISG56, CCL5, e CXCL10 provindas da infecção pelo vírus vacinal, demonstrando importância destes biomarcadores frente a infecções do vírus (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2016).

Estudos têm demonstrado a participação das quimiocinas na polarização de linfócitos T CD4⁺. Martins e colaboradores (2007) demonstraram aumento da expressão de CXCR3 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, um receptor de quimiocinas envolvidas em respostas do tipo Th1 e no recrutamento de linfócitos para o sítio de infecção. (MARTINS et al., 2007; GROOM e LUSTER, 2011). Este mesmo estudo, demonstrou uma mudança no perfil de expressão dos linfócitos T, tendo aumento de CCR2 (30 dias após a imunização), caracterizando uma resposta tipo Th0.

1.4 Estratégias de otimização da vacina antiamarílica

Considerando o cenário epidemiológico da expansão da febre amarela em todo o mundo, algumas estratégias foram propostas nos últimos anos e estimularam o estabelecimento de estudos para otimizar o uso da vacina, por exemplo: a validação de novos lotes-semente, estudos para definir a duração da imunidade e mais recentemente o uso de dose fracionada da vacina antiamarílica em resposta a emergências.

Os grandes surtos da doença na África central e no Brasil, em 2016 elevaram a demanda pela vacina antiamarílica, induzindo uma situação crítica no estoque global e colocando em risco populações que residem em áreas de risco. Em resposta a este cenário, para conter a disseminação internacional da febre amarela, e para o controle de novos surtos, o Grupo Consultivo Estratégico de Especialistas em Imunizações da Organização Mundial de Saúde considerou utilizar a vacinação com a dose fracionada (WHO, 2017).

A estratégia do uso da dose fracionada constitui-se na administração de 1/5 da dose plena, ou seja, 0,1mL. A OMS recomenda que a dose não deve conter menos que 1000 UI. Por ser uma medida emergencial, a dose fracionada deve desempenhar potência equivalente em relação à segurança, imunogenicidade e eficácia (WHO, 2016b; WHO, 2017).

Estudos vêm sendo realizados e suportam a utilização do fracionamento da vacina antiamarílica, indicando cerca de 98% de soropositividade nas populações imunizadas. A OMS tem utilizado essas pesquisas como referencial teórico para implementação do uso dessa estratégia (ROUKENS et al., 2008; MARTINS et al., 2013; CAMPI-AZEVEDO et al., 2014).

1.4.1 Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio- Manguinhos/FIOCRUZ

Houve um aumento na demanda da vacina antiamarílica entre os anos de 2007 e 2008, devido ao crescimento de casos da doença no país. A súbita demanda pela vacina contra febre amarela obrigou Bio-Manguinhos a interromper temporariamente a exportação de vacinas, e o Ministério da Saúde teve ainda que

solicitar à OMS o empréstimo de 5 milhões de doses de seu estoque estratégico. Por ser o maior produtor da vacina antiamarílica, Bio-Manguinhos identificou a necessidade de aumentar a sua capacidade produtiva para atender a demanda nacional e internacional.

O Ministério da Saúde, em documento de 23 de junho de 2008 (ofício nº 141/DEVEP/SVS/MS), dirigido à Fundação Oswaldo Cruz, solicitou estudos com a vacina contra febre amarela, para saber se a utilização em doses menores é semelhante e eficiente à vacina plena.

Para isso, um estudo de teste de potência foi realizado e, segundo Martins e colaboradores (2013) a vacina antiamarílica 17DD de Bio-Manguinhos tem em média 12x mais partículas virais do que o mínimo estabelecido pela Organização Mundial da Saúde. Sendo que após a realização do teste de termoestabilidade a vacina de Bio-Manguinhos passa a ter cerca de 6,6x mais partículas virais que o estabelecido (MARTINS et al., 2013).

Em 2009, seguindo a demanda induzida pelo Ministério da Saúde, Bio-Manguinhos iniciou um estudo de dose-resposta utilizando a vacina contra febre amarela. Esse estudo deveria avaliar a imunogenicidade e segurança em formulações com menores concentrações do vírus vacinal (MARTINS et al., 2013). Com esse intuito, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Bio-Manguinhos realizou o “Estudo de dose-resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz”. Embasado no conhecimento de que a vacina produzida por Bio-Manguinhos possui uma quantidade muito maior de partículas virais do que o mínimo recomendado pela OMS, o estudo objetivava testar a hipótese de que a vacina 17DD em concentração viral menor induziria uma resposta imune semelhante.

O “Estudo de dose-resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz” foi um estudo de não inferioridade, randomizado e duplo-cego, com jovens adultos saudáveis recrutadas de unidades militares da cidade do Rio de Janeiro/RJ. A população do estudo de 900 indivíduos foi dividida em seis grupos vacinais que receberam a vacina antiamarílica em doses decrescentes de partículas virais (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração das doses vacinais utilizadas no “Estudo de dose-resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz”

| Concentrações das doses vacinais | | | |
|-------------------------------------|--------|-------------------|--------|
| Formulação (frações aproximadas) | PFU | MLD ₅₀ | UI |
| Dose plena (referência) | 52.480 | 12.000 | 27.476 |
| 1:3 | 19.953 | 4.000 | 10.447 |
| 1:10 | 5.754 | 1.300 | 3.013 |
| 1:50 | 1.122 | 450 | 587 |
| 1:150 | 302 | 150 | 158 |
| 1:900 | 59 | 50 | 31 |

Tabela 1 – Concentração das doses vacinais utilizadas no “Estudo de dose-resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz”. Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente, foram avaliados: a imunogenicidade, por meio da dosagem de anticorpos neutralizantes (em coletas de sangue realizadas antes e cerca de 30 dias após a primovacinação), a viremia vacinal (coletas de sangue entre três a sete dias após a vacinação) e eventos adversos pós-vacinais (por meio de entrevistas, acompanhamento e exame médicos e realização de exames bioquímicos), comparando-se cada grupo vacinal com o grupo da dose referência. Para avaliar a duração da imunidade, uma nova coleta foi realizada, em aproximadamente um ano após a primovacinação. Os resultados encontrados foram publicados por Martins e colaboradores em 2013. Eles se resumem em: doses até 50x menores induzem resposta protetora equivalente quando comparadas a dose referência. A duração da imunidade se manteve em um ano em todos os grupos vacinais, exceto para o menor grupo de dose (31 UI). A avaliação da viremia não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos. A reatogenicidade foi baixa, não apresentando casos de eventos adversos graves e não houve diferenças entre os eventos adversos observados (MARTINS et al., 2013).

Como complemento do estudo dose-resposta, foi realizada a avaliação de marcadores séricos solúveis (citocinas e quimiocinas). Os resultados foram publicados por Campi-Azevedo e colaboradores (2014), demonstrando que doses até 50x menores são capazes de desencadear imunogenicidade similar à dose

referência, no entanto apenas doses até 3.013 UI (10x menor que a dose referência) foram capazes de induzir cinética da quimiocina CXCL-9, de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IFN- γ e IL-12) bem como de citocinas moduladoras (IL-5 e IL-10) similar a dose referência (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014).

A mesma população foi acompanhada oito anos após a primovacinação, quando os títulos de anticorpos neutralizantes foram avaliados. Martins e colaboradores em 2018 demonstraram que os títulos dos anticorpos dosados pelo teste de PRNT, se mantêm oito anos após a primovacinação, em indivíduos, não revacinados que receberam doses com no mínimo 587UI (MENEZES MARTINS et al., 2018).

Com o intuito de conhecer melhor o comportamento da resposta imune bem como a duração da memória induzida pelas doses menores da vacina antiamarílica, no contexto da resposta imune celular e humoral, este estudo foi desenvolvido para avaliar a duração dos anticorpos neutralizantes, bem como caracterizar os perfis fenotípico e funcional da imunidade celular. As metodologias utilizadas e os resultados encontrados estão dissertados neste documento. Os resultados foram publicados previamente (COSTA-ROCHA et al., 2019).

2 JUSTIFICATIVA

O possível desaparecimento de doenças no cenário local e/ou mundial coloca o ser humano numa situação de decisão para a adesão ou não à vacinação, circunstância essa, agravada pelo contínuo trânsito de *fakes news* que se fixam contra os métodos científico que validam a utilização desta ferramenta, que é a vacina, alimentando a desconfiança da população. O uso de vacinas de vírus vivos atenuados, onde a vacina contra a febre amarela se introduz, sempre esteve envolvido em polêmicas devido ao aparecimento de reações adversas associadas à vacinação, sendo sempre questionado quanto sua segurança. No entanto, os benefícios da vacinação na prevenção de doenças, bem como, suas possíveis reemergências, é totalmente notável após a incorporação dessas vacinas no calendário vacinal.

Nas últimas duas décadas o cenário da febre amarela se agravou em todo o mundo, levando a um esgotamento dos estoques vacinais, e impondo a discussão de medidas para suprir este aumento súbito da demanda da vacina. Uma das iniciativas propostas é a utilização da vacina em doses com concentrações menores de partículas virais. O ajuste fino da dose de vacina em uso atual para um menor número de partículas virais, poderia aumentar a disponibilidade de doses da vacina e suprir as necessidades crescentes a nível nacional e mundial. No entanto, é importante garantir que tais doses menores sejam capazes de induzir proteção semelhante às doses atualmente empregadas.

Não há precedentes de um estudo clínico da avaliação da duração da imunidade, celular e humoral, a longo prazo da vacina 17DD contra febre amarela aplicada em doses menores. Torna-se, portanto, de extrema necessidade saber se a duração da imunidade induzida por doses menores, é duradoura a longo prazo. Neste sentido, a presente pesquisa contribuirá com informações inéditas que poderão subsidiar a recomendação de uso rotineiro da dose fracionada em adultos.

Essa informação é crucial para que a recomendação de uso rotineiro de doses menores possa ser implementada não apenas em campanhas durante os surtos da doença, mas também implantadas no calendário vacinal. Este é um tópico de grande interesse do Programa Nacional de Imunizações e da Organização Mundial da Saúde, uma vez que com a menor concentração de partículas virais determinada, a produção e fornecimento das vacinas poderiam aumentar

rapidamente. Por conseguinte, atenderia tanto o mercado interno quanto externo, visto que Bio-Manguinhos é o maior exportador da vacina antiamarílica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a duração da resposta imune induzida por doses menores da vacina antiamarílica 17DD oito anos após a primovacinação.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a duração dos títulos de anticorpos neutralizantes induzidos por doses menores da vacina antiamarílica 17DD oito anos após a primovacinação;
2. Caracterizar o perfil fenotípico de Linfócitos T e B de memória induzidos por doses menores da vacina antiamarílica 17DD oito anos após a primovacinação;
3. Analisar o perfil funcional de citocinas intracitoplasmáticas induzidos por doses menores da vacina antiamarílica 17DD oito anos após a primovacinação;
4. Construir matrizes de correlações de parâmetros fenotípicos e funcionais da memória imunológica celular e humoral induzidos por doses menores da vacina antiamarílica 17DD oito anos após a primovacinação.

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi projetado pelo Grupo Colaborativo de Estudos em Vacina de Febre Amarela como uma extensão do estudo de dose resposta com a vacina antiamarílica 17DD, inicialmente conduzido por Bio-Manguinhos (FIOCRUZ) em 2009, que avaliou a duração da imunidade humoral e celular específica para febre amarela e forneceu evidências para o uso da estratégia de doses fracionadas.

4.1 Delineamento geral

Este é um estudo observacional de fase IV que acompanha a população incluída no estudo de dose-resposta da vacina antiamarílica 17DD iniciado em 2009, dando seguimento de oito anos após a primovacinação. O protocolo do estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ (Plataforma Brasil, CAAE#65823617.6.3001.5091) e possui registro de ensaio clínico (NCT 03338231). Todos os procedimentos seguiram a Declaração de Helsinki, padrões de ética brasileiros e boas práticas em pesquisas científicas envolvendo humanos.

A participação no estudo foi documentada através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que era lido junto com a equipe de campo do estudo. Um Questionário de Inclusão na Pesquisa (QIP) era aplicado juntamente, para verificação dos critérios de inclusão e exclusão no estudo, a partir da coleta de informações pessoais, tais como: história clínica de doenças atuais e prévias, uso de medicações e história vacinal. O estudo, em todos os tempos de avaliação, foi um estudo basicamente não intervencional, com exceção apenas de coletas de amostras biológicas.

O estudo envolveu adultos do sexo masculino, recrutas do Exército do Rio de Janeiro (uma área não endêmica para febre amarela em 2009), com média de idade de 19,4 anos, que receberam a dose referência e subdoses da vacina antiamarílica 17DD durante o estudo de dose resposta em 2009 (MARTINS et al., 2013).

Para aqueles indivíduos que se apresentaram soronegativos, em quaisquer tempos de avaliação, era realizada a revacinação com a dose plena e em uso

comercial, seguindo o protocolo estabelecido, e automaticamente o indivíduo era retirado das abordagens do projeto.

A população inicial era composta de indivíduos que não apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes (soronegativos pelo teste PRNT) antes da vacinação em 2009 e que não haviam sido revacinados.

Da quantidade total de indivíduos participantes do “Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio- Manguinhos/Fiocruz” em 2009 (n=900), um total de 319 voluntários aderiram ao presente protocolo (8 anos após a primovacinação) e foram elegíveis para a continuidade do estudo. A partir da população elegível, 98 voluntários aceitaram continuar participando do estudo e foram categorizados em 6 grupos, de acordo com a dose vacinal recebida em 2009: 27.476 UI, considerando a dose referência, 10.447 UI, 3.013 UI, 587 UI, 158 UI e 31 UI. Um grupo adicional de 46 adultos do sexo masculino recrutados do Exército vindo de um banco de dados de outro estudo, também realizado pelo nosso grupo (COSTA-PEREIRA et al., 2018) foi incluído como controle não vacinado e referido como NV(dia 0). Um compêndio detalhado da população de estudo e métodos utilizados está provido no diagrama abaixo (Figura 6).

Figura 6 - Fluxograma da população do estudo de acompanhamento de oito anos do “Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz”

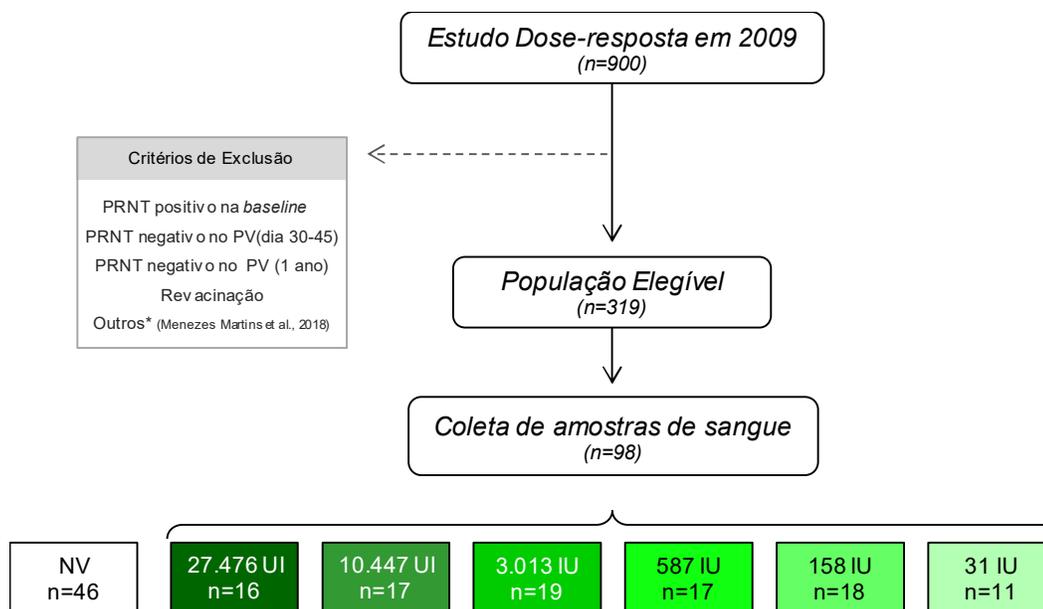


Figura 6 - Fluxograma da população do estudo de acompanhamento de oito anos do “Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz”. Em 2009 os participantes receberam a vacina antiamarilíca 17DD em diferentes formulações e foram segregados em 6 grupos de acordo com a dose recebida, sendo 27.476 UI, considerada a dose referência (■); e as demais subdoses: 10,447 UI (■); 3,013 UI (■); 587 UI (■); 158 UI (■) e 31 UI (■); o grupo controle de indivíduos não vacinados, NV (dia0) como (□). Os critérios de exclusão estão representados na caixa à direita. O n amostral de cada etapa do estudo, bem como o n amostral de cada grupo vacinal estão representados em suas respectivas caixas. Fonte: COSTA-ROCHA et al., 2019 (Adaptado).

No decorrer do “Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz” foram realizadas 4 coletas de amostras biológicas: antes da primovacinação (C1), após 30-45 dias (C2), 1 ano (C3) e 8 anos (C4) após a primovacinação.

O teste de redução de placas por anticorpos neutralizantes (PRNT) foi realizado em amostras de todas as coletas (C1 a C4) para segregação de indivíduos soropositivos e soronegativos. Na quarta coleta, C4, oito anos após a primovacinação, referente ao presente estudo, foram avaliados parâmetros de memória imunológica pelo perfil fenotípico e funcional de células mononucleares de

sangue periférico (PBMC, do inglês: *peripheral blood mononuclear cell*) além da avaliação dos anticorpos neutralizantes.

Na coleta C4, amostras de sangue total foram coletadas de cada voluntário, incluindo 5 mL em tubos na ausência de anticoagulante para o teste de redução de placas por de anticorpos neutralizantes (PRNT) e 20mL na presença de heparina sódica para análises do perfil fenotípico e funcional.

4.2 Critérios de elegibilidade

4.2.1 Critérios de inclusão

Os participantes incluídos no estudo haviam participado como voluntários do “Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz” em 2009. Todos os incluídos eram considerados soronegativos para febre amarela antes da primovacinação em 2009, não foram revacinados durante ou após a participação no estudo de 2009, e foram considerados soropositivos 30-45 dias e 1 ano após a primovacinação.

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os indivíduos nos quais não foi possível realizar coleta de sangue ou aos quais não foi possível ter acesso, devido à impossibilidade de localização, não residência na cidade do Rio de Janeiro ou residentes em áreas de conflito urbano. Além disso, foram suprimidos aqueles que apresentavam soropositividade antes da primovacinação.

4.3 Procedimentos laboratoriais do estudo

4.3.1 Titulação de anticorpos neutralizantes (PRNT)

O método utilizado nesta avaliação de oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD foi o mesmo utilizado nos estudos que antecederam esta avaliação (MARTINS et al., 2013; CAMPI-AZEVEDO et al., 2014).

O teste de redução de placas de lise por anticorpos neutralizantes (PRNT) é considerado o teste padrão-ouro para proteção contra febre amarela. Devido a sua alta especificidade e sensibilidade, os resultados obtidos se correlacionam com proteção em indivíduos vacinados que residem ou visitam áreas endêmicas (NIEDRIG et al., 1999; SIMÕES et al., 2012).

O título de anticorpos neutralizantes dos voluntários foi determinado pelo teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT₅₀) em monocamadas de células Vero, em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ-Rio. O PRNT₅₀ foi realizado conforme previamente descrito por Simões e colaboradores (2012).

De forma resumida, inicialmente os soros dos indivíduos passaram por uma etapa de aquecimento a 56°C por 30min, para inativação do sistema complemento. Após, os soros foram diluídos seriamente (1:5 até 1:640) e juntamente com o vírus vacinal 17DD (30PFU do vírus 17D/213/77/BR-1B/86, lote UEXVFB01) foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente em placa de 96 poços, nos quais as colunas de 1 a 10 receberam soros dos indivíduos; a coluna 11 o soro calibrado, chamado M7/100 sendo utilizado 1.115 UI/mL, e a coluna 12 um controle viral (Figura 7). A solução de soro+vírus foi posteriormente adicionada a uma monocamada já formada de células Vero. Após incubação de 3 horas, meio semissólido contendo carboximetilcelulose (Meio 199) foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas por 7 dias a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após esta incubação, a monocamada de células Vero foi fixada com formalina a 10% e corada com cristal violeta 0,04%. As placas de lise foram contadas utilizando um projetor de diapositivo adaptado e os títulos de anticorpos foram calculados. Um soro padrão proveniente de macaco rhesus, previamente calibrado frente a um soro referência da OMS, foi utilizado como referência.

Figura 7 – Foto de uma placa de 96 poços utilizada para a realização do micro-PRNT

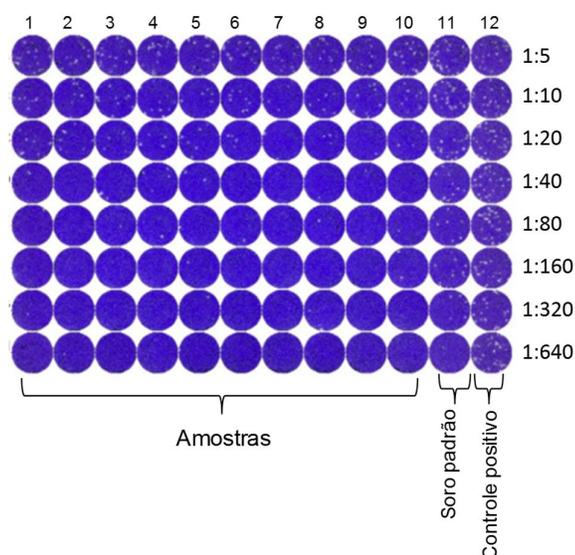


Figura 7 – Foto de uma placa de 96 poços utilizada para a realização do micro-PRNT. Da esquerda para a direita: as colunas de 1 a 10 foram utilizadas para as amostras dos indivíduos avaliados. A coluna 11 utilizada para um soro de padrão interno; a coluna 12 utilizada para um controle positivo. Todas as amostras de soro foram diluídas em série de 1:5 até 1:640. Fonte: SIMÕES et al., 2012 (Adaptado).

Para se estimar em qual diluição ocorreria 50% de redução do número de placas de lise, foi utilizado um modelo de regressão linear, usando os valores das recíprocas das diluições e os números de placas imediatamente inferior e superior a 50%. O título médio do soro padrão permitiu a determinação das unidades internacionais de proteção contidas em cada amostra (SIMÕES et al., 2012).

4.3.2 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O sangue total heparinizado foi previamente centrifugado a 3000rpm (SL 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) por 10min a 21°C (temperatura ambiente), para retirada do plasma sanguíneo. O creme leucocitário e a papa de hemácias foram diluídos em meio RPMI 1640 incompleto (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, DE) em proporção 1:1 e foi lentamente adicionado a uma solução de Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt,

DE) na proporção de 2:1, em tubos de poliestireno com capacidade para 15mL. Os tubos foram centrifugados a 1800rpm (SL 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durante 40 minutos a 21°C (ACC=3; DEC=3). Ao final da centrifugação, obteve-se o “anel de PBMC” na interface do Histopaque® e do meio de cultura. As PBMC foram coletadas e transferidas para tubos cônicos de polipropileno de 50mL, seguido de uma lavagem com RPMI 1640 incompleto a 1300rpm (SL 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) por 7 minutos a 4°C (ACC=9; DEC=4). Caso houvesse presença de eritrócitos, uma lise utilizando cloreto de amônio (1x) era realizada por 10min em temperatura ambiente. Após centrifugação, 1300rpm (SL 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) por 7 minutos a 4°C (ACC=9; DEC=4), as PBMC seguiam para uma última centrifugação com RPMI 1640 incompleto a 1300rpm (SL 16R Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) por 7 minutos a 4°C (ACC=9; DEC=4) para retirada de vestígios de cloreto de amônio. Finalmente, as PBMC foram ressuspensas em RPMI 1640 incompleto, contadas em contador automatizado Countess™ (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e ajustadas para $2,0 \times 10^7$ células/mL.

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

4.3.3 Cultura *in vitro* antígeno-específica de longa duração

Para quantificar as frequências de linfócitos T e B de memória, bem como células produtoras de citocinas intracitoplasmáticas pró-inflamatórias e reguladoras, amostras de PBMC foram incubadas na ausência e presença do antígeno vacinal 17DD ($2,5 \times 10^3$ /mL partículas virais, lote L173VFC0312).

Em placas de 96 poços de fundo em U, foram destinados quatro poços para linfócito T (LT), sendo dois poços para cultura controle (CC- ausência do antígeno vacinal 17DD) e dois para cultura estimulada (CE- presença do antígeno vacinal 17DD). Para linfócitos B (LB), foi utilizada a mesma estratégia de distribuição de poços. Para pesquisa de citocinas intracitoplasmáticas (CIC), foram destinados oito poços, sendo quatro para CC e quatro CE. Ensaios de controle positivo foram realizados utilizando células incubadas na presença de meio de cultura (RPMI 1640) + 1,25µg/mL de Fitohemaglutinina (PHA - cultura com mitógeno – controle positivo).

Também foram separados poços destinados a controle de células não marcados com anticorpos monoclonais fluorescentes (CG- controle de ajuste do *gate* de linfócitos no citômetro de fluxo), no qual as células foram incubadas apenas com o meio de cultura. Os controles eram realizados apenas quando o volume de células era suficiente para sua execução, dando sempre prioridade para as culturas de pesquisa de LT e LB.

Para realização da cultura de longa duração o meio utilizado foi o meio de cultura CMBlast (5% de soro fetal humano + 1,6% de L-glutamina + 3% de antibiótico/antimicótico + RPMI 1640). Em cada poço o volume final foi de 200µL, sendo 162,5µL de CMBlast somado a 25µL de PBMC. A concentração de PBMC/poço foi de $5,0 \times 10^5$ células. De forma específica, para os poços CE foram adicionados 12,5µL do antígeno vacinal. Para CC e CG usou-se o mesmo volume (12,5 µL) de PRMI 1640 incompleto. As culturas foram incubadas por 144 horas a 37°C, 5% CO₂ em estufa úmida.

4.3.4 Caracterização do perfil fenotípico de linfócitos T e B

Antes de realizar a marcação das células, misturas de anticorpos monoclonais fluorescentes foram preparadas para marcação de moléculas da superfície celular.

Após a cultura de 144 horas, uma centrifugação foi realizada para retirada do meio de cultura. Em seguida, as PBMC foram ressuspendidas e lavadas com tampão salina fosfato estéril (PBS 1X) e, então, incubadas com corante LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (1:1000x), que permite a identificação das células viáveis e a exclusão das células mortas na análise dos dados adquiridos por citometria de fluxo. Em seguida, as células foram lavadas com tampão salina fosfato suplementado com 0,5% de albumina bovina estéril (PBS-Wash). Logo após, as células foram incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz com as misturas previamente preparadas com anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície para identificação de linfócitos T e B, bem como subpopulações de células *naive* e de memória.

Os anticorpos utilizados para o preparo das misturas empregadas para a marcação de superfície de células T e B estão descritos no quadro abaixo (Quadro 2).

Quadro 2 – Anticorpos monoclonais fluorescentes utilizados para avaliar populações e subpopulações de linfócitos T e B de memória

| MARCADOR | CLONE | FLUOROCROMO | ALVOS | |
|----------|--------|-------------|-----------|-----------|
| | | | Células T | Células B |
| CD3 | SK7 | APC-Cy7 | + | |
| CD4 | RPA-T4 | FITC | + | |
| CD8 | SK1 | PerCP-Cy5.5 | + | |
| CD19 | HIB19 | PerCP | | + |
| CD27 | M-T271 | PE | + | + |
| CD45RO | UCHL1 | PE-Cy7 | + | |
| IgD | IA6-2 | FITC | | + |

Quadro 2 – Anticorpos monoclonais fluorescentes utilizados para avaliar populações e subpopulações de linfócitos T e B de memória. Anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície celular, clone e fluorocromos empregados na produção do anticorpo monoclonal utilizado. O símbolo “+” indica a população celular alvo, sendo a cor azul representativa da população de células T e a cor laranja da população de células B. Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a incubação, foi realizada fixação a base de formaldeído (citrato de sódio + formaldeído + dietilenoglicol + heparina sódica) por 10 min. Em seguida as células foram lavadas com PBS-Wash, e ressuspendidas em PBS-1x. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo pelo equipamento LSRFortessa (BD Bioscience, San Diego, California, USA) em um total de até 100.000 linfócitos por amostra.

4.3.5 Caracterização do perfil funcional de linfócitos T e B produtores de citocinas

Misturas de anticorpos monoclonais fluorescentes foram preparadas para marcação da superfície celular e citocinas intracitoplasmáticas (Quadro 3).

Quatro horas antes do término do final do período de incubação, foram adicionados 10µL de Brefeldina A (200mg/mL). A utilização de Brefeldina A promove

a retenção de citocinas no complexo de Golgi, assim, permitindo a detecção posterior por citometria de fluxo. Após esta incubação, foram adicionados 20µL de EDTA (20mM) seguido de uma incubação de 15 min, até completar as 144 horas. Esta etapa é importante para bloquear posteriores processos de ativação das células, garantindo um padrão na ativação.

Após a cultura de 144 horas, foi realizada uma centrifugação para retirada do meio de cultura. Em seguida, as PBMC foram ressuspensas e lavadas com tampão salina fosfato estéril (PBS 1X) e, então, incubadas com corante de LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (1:1000x). As células foram lavadas com tampão salina fosfato suplementado com 0,5% de albumina bovina estéril (PBS-Wash). Logo após, as células foram incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz com as misturas de anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície celular para identificação de linfócitos T e B, preparadas previamente (Quadro 3).

Após a incubação, foi realizada fixação a base de formaldeído (citrato de sódio + formaldeído + dietilenoglicol + heparina sódica) por 10 min. Em seguida, as células foram lavadas com PBS-Wash. Ao final, as células foram permeabilizadas com tampão salina fosfato suplementado com 0,5% de albumina bovina e 0,5% saponina estéril (PBS-P) e marcadas com anticorpos monoclonais anti-moléculas intracitoplasmáticas (Quadro 3).

Após lavagens sucessivas com PBS-P e PBS-Wash, as células foram ressuspensas em PBS-1X. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo pelo equipamento LSRFortessa em um total de até 100.000 linfócitos por amostra.

Quadro 3 - Anticorpos monoclonais fluorescentes utilizados para avaliar citocinas intracitoplasmáticas em populações e subpopulações de linfócitos T e B

| MARCADOR | CLONE | FLUOROCROMO | ALVOS | |
|---------------|------------|----------------|-----------|-----------|
| | | | Células T | Células B |
| CD3 | UCHT1 | Qdot605 | + | |
| CD4 | GK1.5 | APCe-Fluor780 | + | |
| CD8 | SK1 | PerCP | + | |
| CD19 | HIB19 | Alexa-Fluor700 | | + |
| TNF- α | MAb11 | PE-Cy7 | + | + |
| IFN- γ | B27 | Alexa-Fluor488 | + | |
| IL-5 | JES1-39D10 | PE | + | + |
| IL-10 | JES3-19F1 | APC | + | + |

Quadro 3 - Anticorpos monoclonais fluorescentes utilizados para avaliar citocinas intracitoplasmáticas em populações e subpopulações de linfócitos T e B. Anticorpos monoclonais anti-moléculas de superfície celular/citocinas, clone e fluorocromos empregados na produção do anticorpo monoclonal utilizado. O símbolo “+” indica a população celular alvo, sendo a cor azul representativa da população de células T e a cor laranja da população de células B. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Análise do perfil fenotípico e funcional

Após a marcação fenotípica/funcional e aquisição por citometria de fluxo, análises utilizando software FlowJo-9.3.2 (LLC, Ashland, OR, USA) foram empregadas para determinar subpopulações de linfócitos T e B para o perfil fenotípico, bem como, produtores de citocinas, para o perfil funcional. Compensações *off-line* foram realizadas quando necessário.

4.4.1 Linfócitos T

Inicialmente, empregando parâmetros “FSC-A x FSC-H”, os singletos, células que foram adquiridas unicamente, excluindo possíveis agrupamentos, foram selecionados. Em seguida, utilizando “FSC-A x LIVE/DEAD”, as células vivas foram

selecionadas, excluindo as células na parte superior do gráfico, uma vez que é possível diferenciá-las devido ao acúmulo intracelular do corante LIVE/DEAD™ em células mortas. Empregando os parâmetros de “FSC-A x SSC-A”, foi criado um *gate* na população de linfócitos. Depois, utilizando “Time x FSC-A”, foi realizada a seleção de células que foram adquiridas sem interrupções, como: bolhas, ausência de fluídos, entre outros motivos. Dentro da população de linfócitos totais, a população CD3⁺ foi selecionada através dos parâmetros “CD3 APC-Cy7 x SSC-A”. A partir dos linfócitos CD3⁺, subpopulações de CD4⁺ e CD8⁺ foram segregadas empregando “CD4 FITC x CD8 PerCP-Cy5.5”. Após a seleção da subpopulação de interesse (CD4⁺ - LT auxiliar ou CD8⁺ - LT citotóxico), os fenótipos de memória foram avaliados. Para isso, os parâmetros “CD27 PE x CD45RO PE-Cy7” foram empregados. Desta forma, linfócitos T auxiliares *naïve* (NCD4) foram caracterizados pelo fenótipo CD4⁺CD27⁺CD45RO⁻, linfócitos T auxiliares *early effector* (EefCD4) foram caracterizados pelo fenótipo CD4⁺CD27⁻CD45RO⁻, linfócitos T auxiliares de memória central (CMCD4) foram identificados por CD4⁺CD27⁺CD45RO⁺ e os linfócitos T auxiliares de memória efetora (EMCD4) foram identificados pelo fenótipo CD4⁺CD27⁻CD45RO⁺. Os mesmos fenótipos de memória foram investigados na população de linfócitos TCD8⁺ aplicando os mesmos parâmetros citados anteriormente (Figura 8).

Figura 8 - Estratégias de análises para populações e subpopulações de memória de linfócitos T

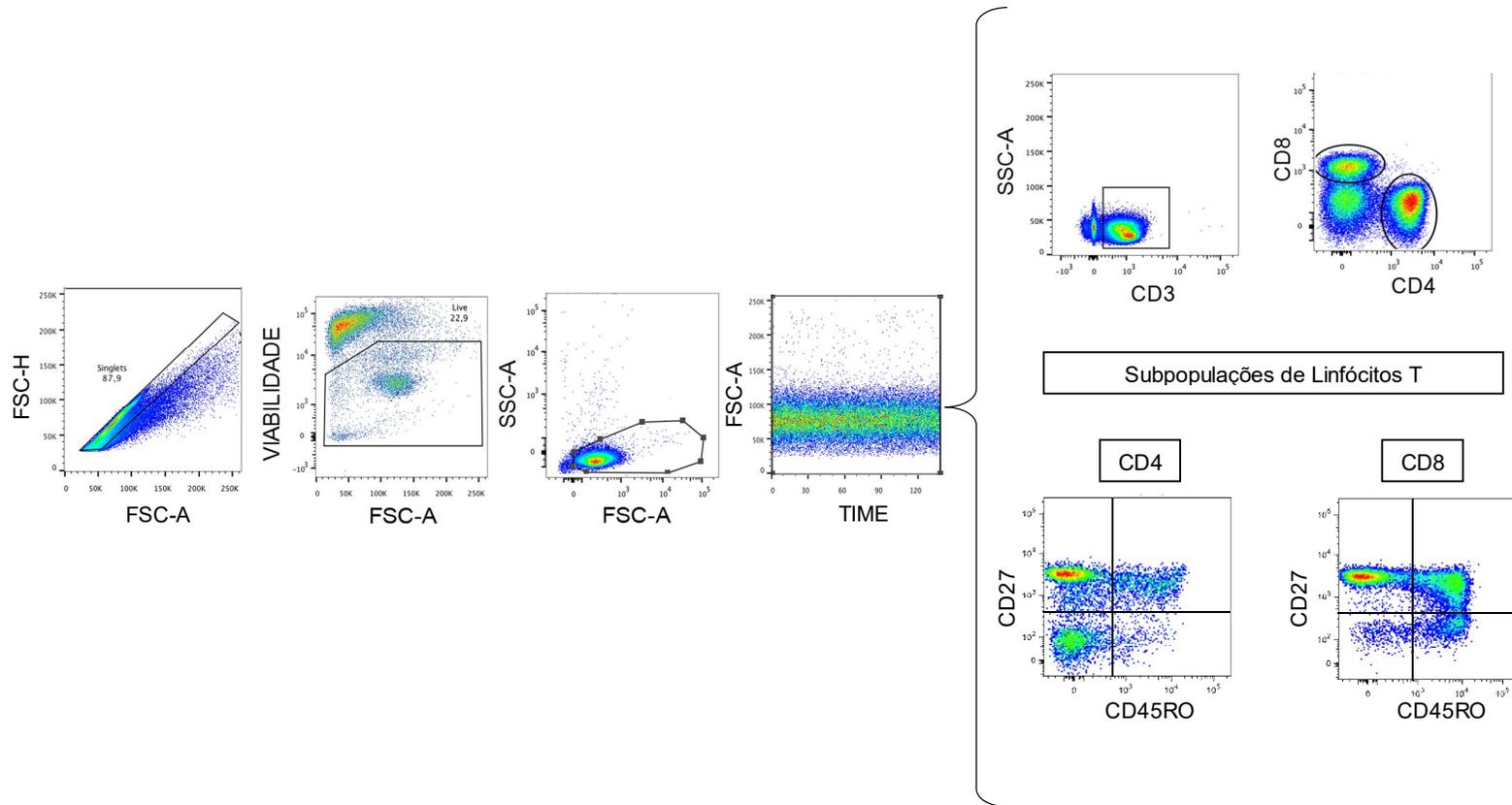


Figura 8 - Estratégias de análises para populações e subpopulações de memória de linfócitos T. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.2 Linfócitos B

Inicialmente a população de linfócitos totais foi selecionada através da conjugação de parâmetros “FSC-A x SSC-A”, seguida da seleção dos singletos por “FSC-A x FSC-H” e, por fim, seleção das células adquiridas sem interrupções por “Time x FSC-A”. Os linfócitos B foram segregados, inicialmente, utilizando “CD19 PerCP x CD3 APC-Cy7”, e as células CD19⁺ foram selecionadas. A partir desta seleção, utilizando os parâmetros “CD19 PerCP x LIVE/DEAD”, os linfócitos B (CD19⁺) viáveis foram identificados, selecionando as células nas quais não houve internalização do composto (células da parte inferior do gráfico). Por fim, seguindo a metodologia descrita por Changanti e colaboradores (2009), os fenótipos de memória foram investigados utilizando “IgD FITC x CD27 PE”. A partir deste gráfico, os linfócitos B *naïve* (NCD19) foram caracterizados pelo fenótipo CD19⁺CD27⁻IgD⁺, linfócitos B de memória não clássica (nCMCD19) foram fenotipados como CD19⁺IgD⁺CD27⁺ e, por fim, os linfócitos B de memória clássica (CMCD19) foram caracterizados pelo fenótipo CD19⁺IgD⁻CD27⁺ (Figura 9).

Figura 9 - Estratégias de análises para populações e subpopulações de memória de linfócitos B

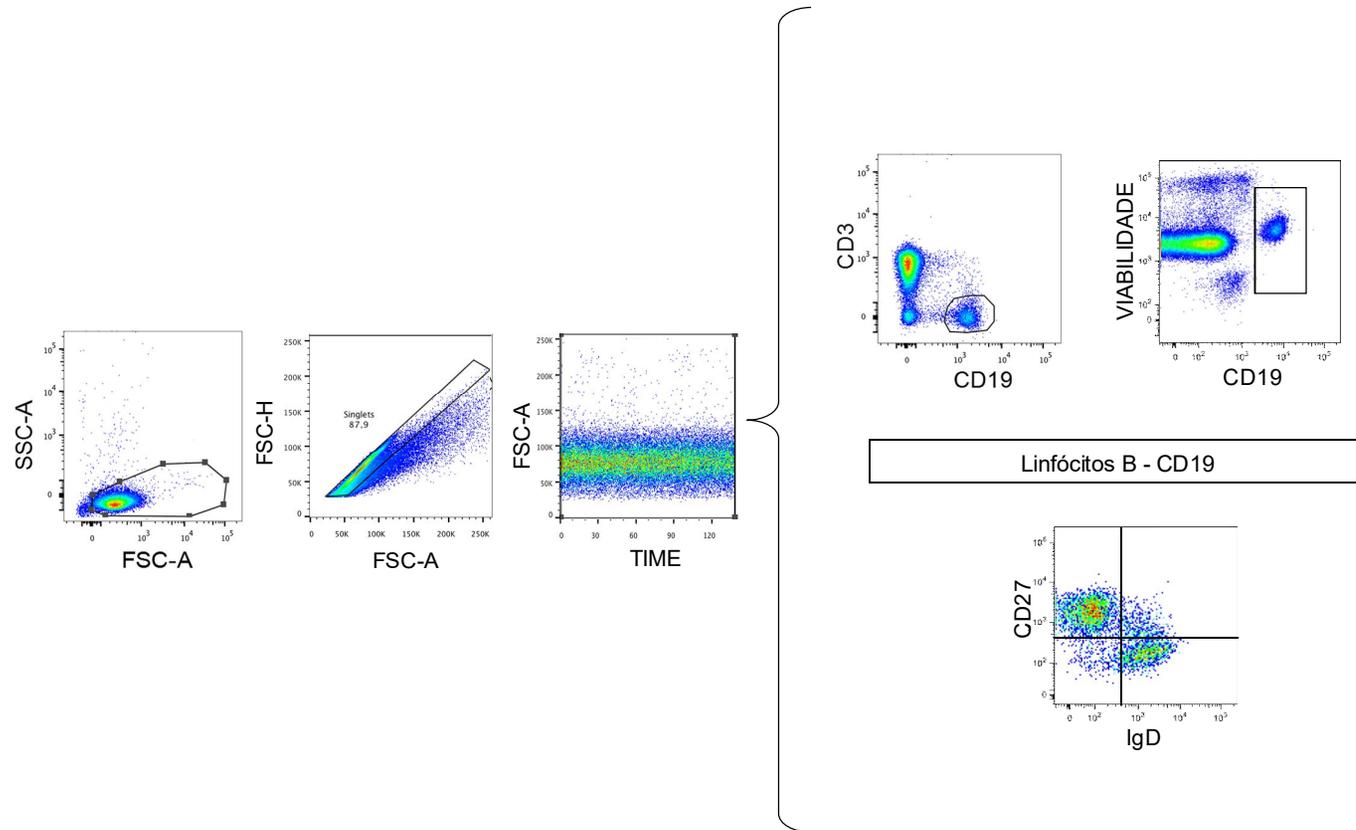


Figura 9 - Estratégias de análises para populações e subpopulações de memória de linfócitos B. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.3 Citocinas Intracitoplasmáticas

Seguindo o protocolo para identificação de linfócitos produtores de citocinas utilizando o software FlowJo-9.3.2 (LLC), os singletos foram selecionados utilizando os parâmetros “FSC-A x FSC-H”, acompanhada da construção de gráfico com os parâmetros “Time x FSC-A”. Por fim, finalizando as investigações morfométricas, foram empregados os parâmetros “FSC-A x SSC-A” para seleção da população de interesse, os linfócitos. De forma conseguinte, “CD3 Qdot 605 x LIVE/DEAD” foi utilizado para segregação dos linfócitos T CD3⁺ viáveis. Partindo dos linfócitos T CD3⁺, as subpopulações de CD4⁺ e CD8⁺ foram segregadas empregando “CD4 APCe-Fluor780 x CD8 PerCP”. A investigação dos linfócitos B CD19⁺ viáveis foi realizada empregando “CD19 Alexa Fluor 700 x LIVE/DEAD”. Uma vez identificadas as subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ - LT auxiliar ou CD8⁺ - LT citotóxico) e a população de linfócitos B, foram investigadas aquelas células produtoras de citocinas, utilizando anti-TNF- α /PE-Cy7, IFN- γ /Alexa-Fluor488, IL-5/PE e IL-10/APC (Figura 10).

Figura 10 - Estratégias de análises para populações e subpopulações de linfócitos T e B produtores de citocinas

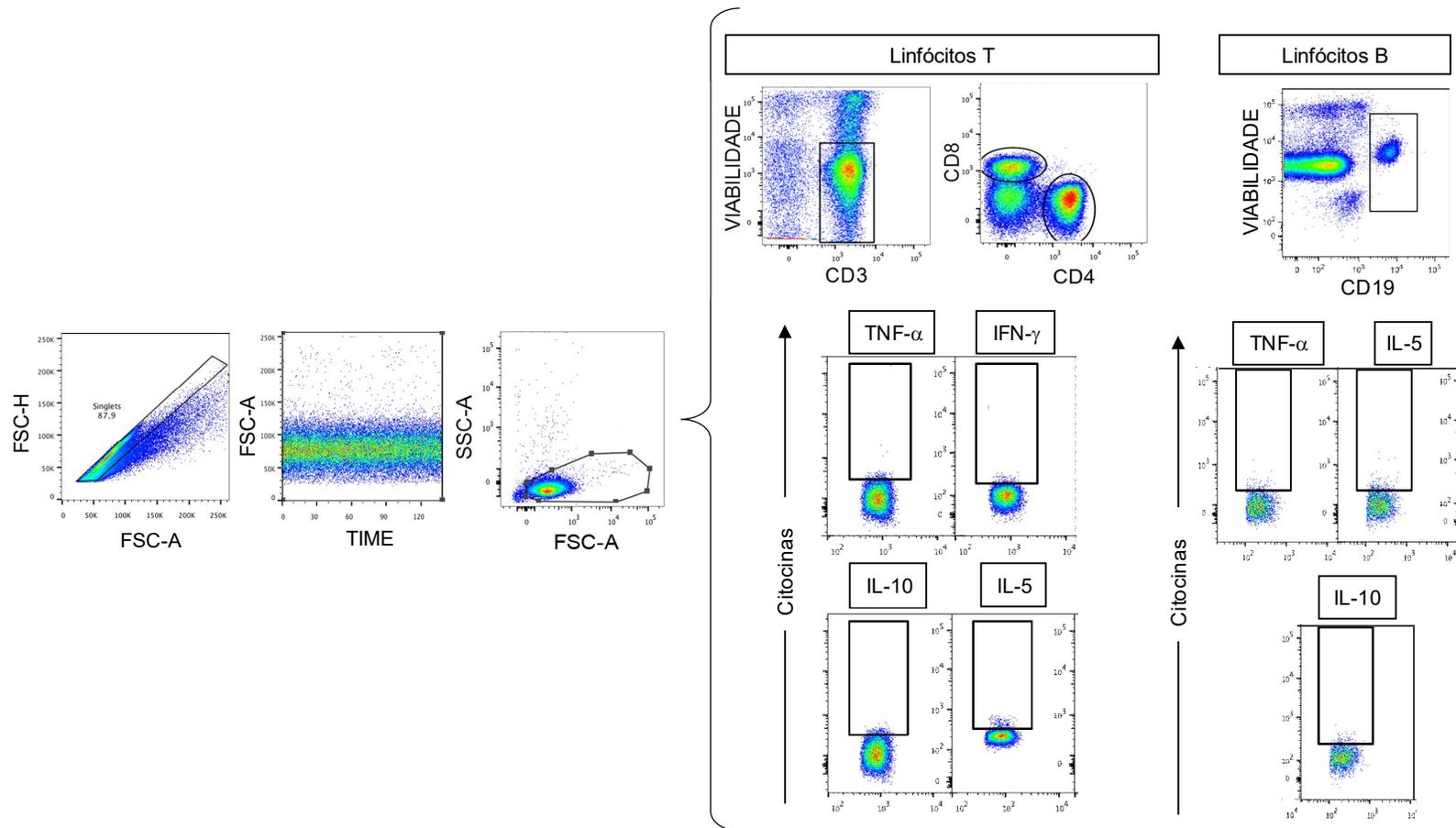


Figura 10 - Estratégias de análises para populações e subpopulações de linfócitos T e B produtores de citocinas. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Estratégias de análises

4.5.1 Matrizes de redes de biomarcadores

Para o cálculo do coeficiente de correlação foram utilizados os resultados encontrados nas análises dos perfis imunológicos, fenotípico e funcional, bem como dos títulos de anticorpos neutralizantes. De acordo com a distribuição teórica da variável, diferentes testes de correlações foram aplicados. Para aquelas que seguiam uma distribuição normal foi escolhido o teste de correlação de Pearson. Para aquelas que não seguiam uma distribuição teórica conhecida foi realizado o teste de correlação de Spearman.

O coeficiente de correlação é uma medida adimensional e a força do grau da relação entre as variáveis pode ser definida por qualquer valor entre -1 e +1. Como classificação do grau de correlação, ou seja, da força entre as variáveis, utilizou-se os seguintes parâmetros: fraco quando $0 < r < 0,5$ e forte quando $0,5 < r < 1,0$. Os mesmos parâmetros foram aplicados para correlações com valores negativos, sendo fraco quando $-0,5 < r < 0$ e forte quando $-1,0 < r < -0,5$. Se o coeficiente se apresentou como um número positivo, as variáveis são diretamente relacionadas (ou seja, quando o valor de uma variável aumenta, o valor da outra também tende a aumentar). De modo inverso, se o coeficiente for um número negativo, as variáveis são inversamente relacionadas (ou seja, quando um valor de uma das variáveis cresce, o valor da outra tende a seguir o padrão oposto). Foram consideradas correlações com significância estatística as que apresentaram $p \leq 0,05$.

Para a análise dos dados foi utilizado o software Graphpad Prisma (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) versão 5.0.

4.5.2 Análises estatísticas

A caracterização dos perfis fenotípico e funcional de linfócitos T e B de memória, induzidos *in vitro* pelo antígeno vacinal 17DD, foi avaliada utilizando o índice das culturas, que consiste na razão do percentual de células na cultura estimulada dividido pelo percentual de células na cultura controle (Cultura Estimulada/Cultura Controle). Os níveis de anticorpos neutralizantes foram expressos como títulos médios geométricos com 95% de intervalo de confiança de

\log_{10} mUI/mL. O *cut-off* 2,7 \log_{10} mUI/mL foi utilizado para segregar aqueles indivíduos que soroconverteram ou não.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), para análises dos títulos de anticorpos neutralizantes e taxas de soropositividade foi realizado o teste ANOVA seguido de Tukey para comparações entre os grupos. O teste de Mann-Whitney foi realizado para comparações entre dois grupos nos perfis fenotípicos e funcionais. Em todos os casos, as diferenças significantes foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

4.5.3 Proporção iterativa

O cálculo da proporção iterativa foi realizado utilizando as frequências de soropositividade dos anticorpos neutralizantes obtidas em todas as análises realizadas no estudo dose-resposta (30-45 dias, 1 ano e 8 anos após a primovacinação).

Foi realizada a multiplicação dos percentuais ao longo tempo, logo, a proporção iterativa é o produto das percentagens individuais ao longo do tempo. Essa abordagem foi escolhida com o intuito de computar e retirar as possíveis perdas ao longo do processo.

Além do cálculo da proporção iterativa de cada grupo vacinal, foi calculada uma média das taxas das soropositividades de todos os grupos. As frequências de cada grupo foram então comparadas com a frequência geral das taxas de soropositividade encontradas na análise de oito anos.

5 RESULTADOS

Os resultados referentes a este estudo de seguimento do “*Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz*” foram previamente publicados por Costa-Rocha e colaboradores em 2019. Mas a título de melhor detalhamento, todos foram dissertados nesta seção (COSTA-ROCHA et al., 2019).

5.1 Avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes específicos para febre amarela oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD

O teste de neutralização por redução de placas lise (PRNT) foi realizado para a avaliação dos títulos de anticorpos neutralizantes específicos para febre amarela. Este teste foi realizado para todos aqueles voluntários incluídos nesta avaliação de oito anos, e que haviam soroconvertido com a primovacinação utilizando a vacina 17DD reformulada em doses menores, que se mantiveram positivos um ano após a primovacinação e que não foram revacinados.

Para a análise dos dados obtidos com o PRNT, foi padronizado um *cut-off* com o intuito de segregar aqueles indivíduos que haviam soroconvertido oito anos após a primovacinação, definindo $>2,7 \log_{10}$ mUI/mL ou cerca de 1:20 da recíproca da diluição. Por fim, os títulos médios geométricos e a taxa de soropositividade dos indivíduos foram determinados e ambos os resultados foram apresentados em gráficos de barras, Figura 11 (A) e Figura 11 (B), respectivamente.

Pode-se perceber que os voluntários que soroconverteram com a primovacinação utilizando a vacina 17DD em doses menores e não foram revacinados ainda apresentam níveis de anticorpos e taxas de soropositividade similares em todas as subdoses administradas quando comparadas com a dose referência (27.476 UI), diferindo do grupo controle NV(dia0) (Figura 11).

Figura 11 - Níveis de anticorpos neutralizantes e taxas de soropositividade utilizando o teste de PRNT oito anos após a vacinação primária com doses menores da vacina 17DD

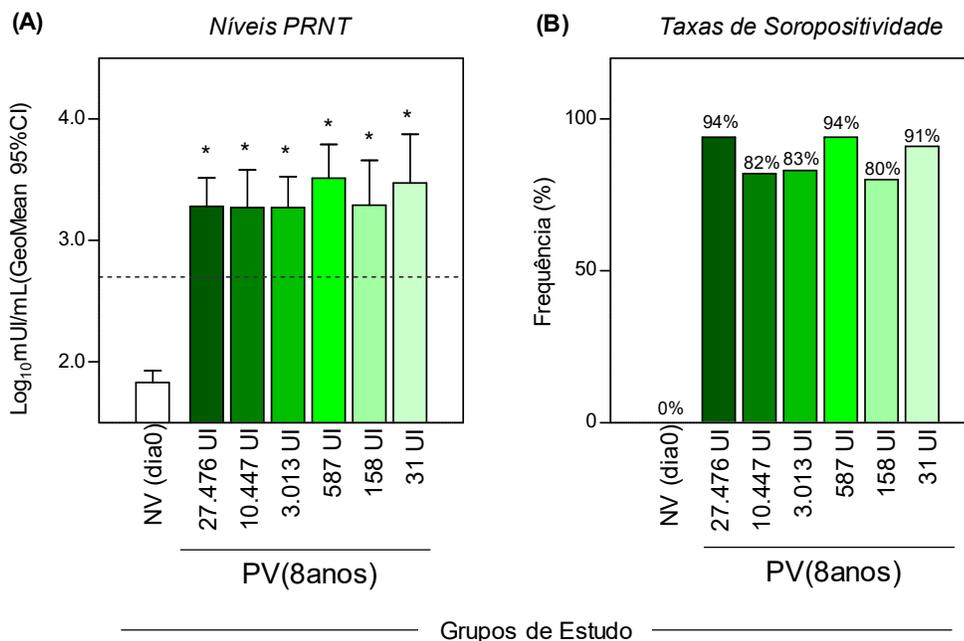


Figura 11 - Níveis de anticorpos neutralizantes e taxas de soropositividade utilizando o teste de PRNT oito anos após a vacinação primária com doses menores da vacina 17DD. (A) Os níveis de anticorpos neutralizantes estão expressos como títulos médios geométricos com 95% de intervalo de confiança de \log_{10} mUI/mL. O *cut-off* 2,7 \log_{10} mUI/mL está representado como a linha tracejada. (B) As taxas de soropositividade estão expressas em frequência (%). Em ambos os gráficos os grupos de estudos estão dispostos no eixo x, 27.476 UI, considerada a dose referência (■); 10.447 UI (■); 3.013 UI (■); 587 UI (■); 158 UI (■) e 31 UI (■). O grupo controle de indivíduos não vacinados, NV (dia0) está representado como (□). A análise comparativa dos níveis dos anticorpos neutralizantes e as taxas de soropositividade foram avaliadas por ANOVA, ajustada para comparações múltiplas de Tukey, respectivamente. Em todos os casos, diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e destacadas por asterisco (*) em comparação ao grupo não vacinado (NV (dia0)). Fonte: COSTA-ROCHA et al., 2019 (Adaptado).

5.2 Análise da proporção iterativa das taxas de soropositividade durante os tempos de análises do Estudo Dose-Resposta

Para determinar de uma forma mais detalhada o desempenho das doses menores da vacina 17DD, se tratando de resposta humoral e taxas de

soropositividade, uma proporção iterativa foi calculada, gerando uma taxa de soropositividade global para cada dose utilizada no estudo. Foram utilizadas as frequências das taxas de soropositividade em todo o período de seguimento do Estudo Dose-Resposta, logo após a primovacinação (30-45 dias), 1 ano após a primovacinação e 8 anos após (Figura 12).

Os resultados demonstram que, na avaliação de 30-45 dias, aqueles indivíduos que receberam a dose de 27.476 UI (dose referência) até a dose com 587 UI apresentam imunogenicidade similar entre si (96, 100, 97 e 97%, respectivamente), enquanto os grupos que receberam doses de 157 UI e 31UI exibem baixas proporções das taxas de soropositividade (87 e 56%, nessa ordem).

A análise realizada 1 ano após a primovacinação incluiu apenas indivíduos que haviam soroconvertido na análise anterior, ou seja, 30-45 após a primovacinação e não haviam sido revacinados. Observando os resultados, pode-se perceber que altas taxas de soropositividade foram mantidas por até 1 ano entre os grupos 27.476 UI, 10.446 UI, 3.013 UI, 587 UI e 158 UI (99, 97, 99, 100 e 97%, respectivamente), exceto para o grupo imunizado com a dose de 31 UI, que apresentou 89% de soropositividade.

Na análise atual, 8 anos após a primovacinação, foram incluídos aqueles voluntários que soroconverteram na análise de 30-45 dias após a primovacinação, em 2009 e mantiveram a soropositividade até a análise realizada com 1 ano de vacinação e não foram revacinados.

Indivíduos com resultado negativo (não soroconverteram) no PRNT nos tempos de 30-45 dias ou um ano após a primovacinação não foram incluídos na análise de acompanhamento, pois foram revacinados como parte do protocolo do estudo e, portanto, o número de vacinados elegíveis diminui com o tempo.

A taxa de soropositividade global foi calculada utilizando as frequências de cada grupo vacinal oito anos após a primovacinação (94, 82, 83, 94, 80 e 91%, correspondentemente) (Figura 11 (B) e Figura 12), apresentando um valor de 87%.

Sendo assim, foram observadas proporções iterativas adequadas em apenas grupos vacinais acima do grupo 587 UI que induziram imunogenicidade semelhantes entre si e comparáveis com a taxa de soropositividade global (89, 80, 80 e 91%, respectivamente), enquanto os grupos vacinais 158UI e 31UI atingiram menor proporção de taxas de soropositividade (68 e 46%, nessa ordem). Em suma, pode

se observar um decréscimo progressivo das taxas de soropositividade ao longo do tempo (Figura 12).

Figura 12 - Proporção iterativa das taxas de soropositividade ao longo do Estudo Dose-Resposta após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD

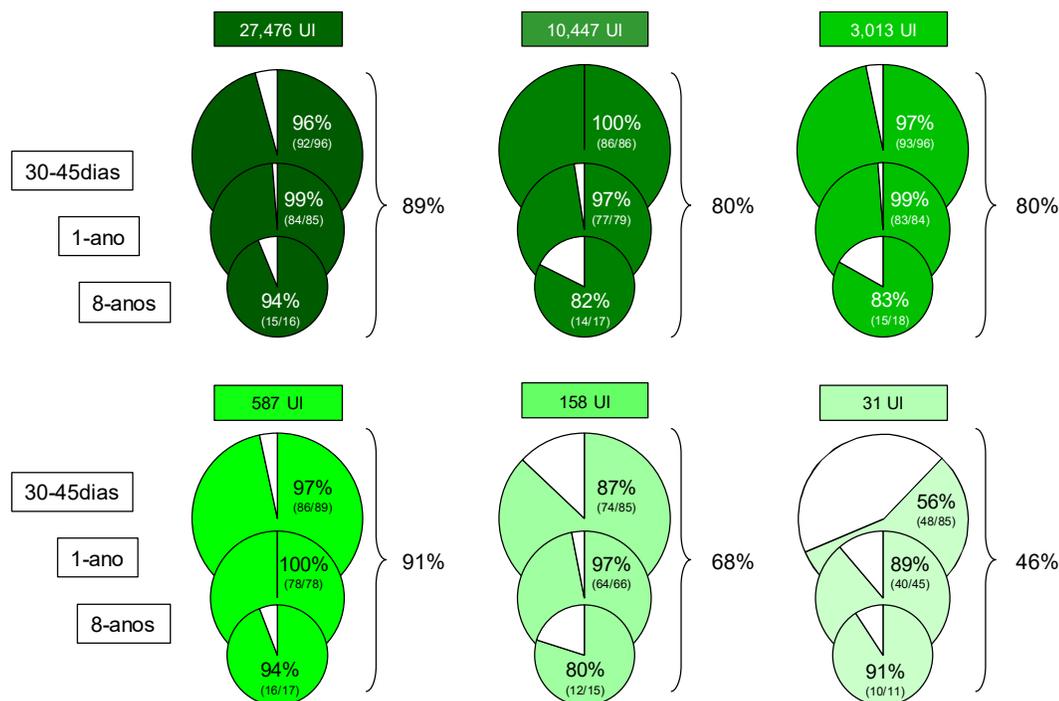


Figura 12 - Proporção iterativa das taxas de soropositividade ao longo do Estudo Dose-Resposta após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram definidos utilizando o mesmo teste de PRNT em todos os tempos de análises do Estudo Dose-Resposta. O ponto de corte para soropositividade foi estabelecido em $>2,7 \log_{10} \text{mUI/mL}$ ou cerca de 1:20 da recíproca da diluição. Os indivíduos foram categorizados em seis grupos em cada tempo de análise (30-45 dias, 1 ano e 8 anos) de acordo com a dose vacinal administrada em 2009: 27.476 UI, considerada a dose referência (●); 10.447 UI (●); 3.013 UI (●); 587 UI (●); 158 UI (●) e 31 UI (●). O ajuste proporcional iterativo das taxas de soropositividade foi calculado para análises comparativas entre os grupos. Fonte: COSTA-ROCHA et al., 2019 (Adaptado).

5.3 Análise dos perfis fenotípicos e funcionais de memória celular após estímulo *in vitro* com antígeno vacinal 17DD.

Os perfis de memória celular fenotípica e funcional específicas para febre amarela oito anos após a primovacinação com diferentes doses da vacina 17DD

estão mostrados nas Figuras 13 e 14. Os biomarcadores de memória foram determinados após estimulação *in vitro* com antígeno vacinal 17DD e os resultados estão apresentados como Index da Cultura estimulada 17DD/cultura controle.

Na Figura 13 estão apresentados os perfis fenotípicos da memória celular de todos os grupos vacinais analisados neste estudo, bem como do grupo controle de indivíduos não vacinados. A análise dos biomarcadores fenotípicos revelou que independente da dose utilizada na primovacinação, pode-se perceber altos níveis de NCD4 em todos os indivíduos vacinados quando comparados com o grupo controle de indivíduos não vacinados (NV (dia0)). Baixos níveis de eEfCD8 e nCMCD19 foram similares entre os grupos vacinais quando comparados com o grupo NV (dia0).

Perfis similares a “ondas” foram observados para eEfCD4 em 4 das 5 doses testadas (10.447 UI, 3.013 UI, 158 UI e 31UI). Três perfis distintos foram observados para o fenótipo CMCD19, altos níveis no grupo vacinal 10.447 UI e baixos níveis nos grupos 158 UI e 31UI. De forma notável, pode-se observar aumento nos níveis de CMCD4 e EMCD8 em todos os indivíduos vacinados com todas as doses vacinais incluídas no estudo.

Os achados demonstram que os indivíduos oito anos após a primovacinação ainda apresentam memória celular específica para febre amarela, sobretudo níveis excepcionais de CMCD4 e EMCD8 quando comparados com a dose referência (Figura 13).

Figura 13 - Biomarcadores de memória fenotípica específica para febre amarela oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD

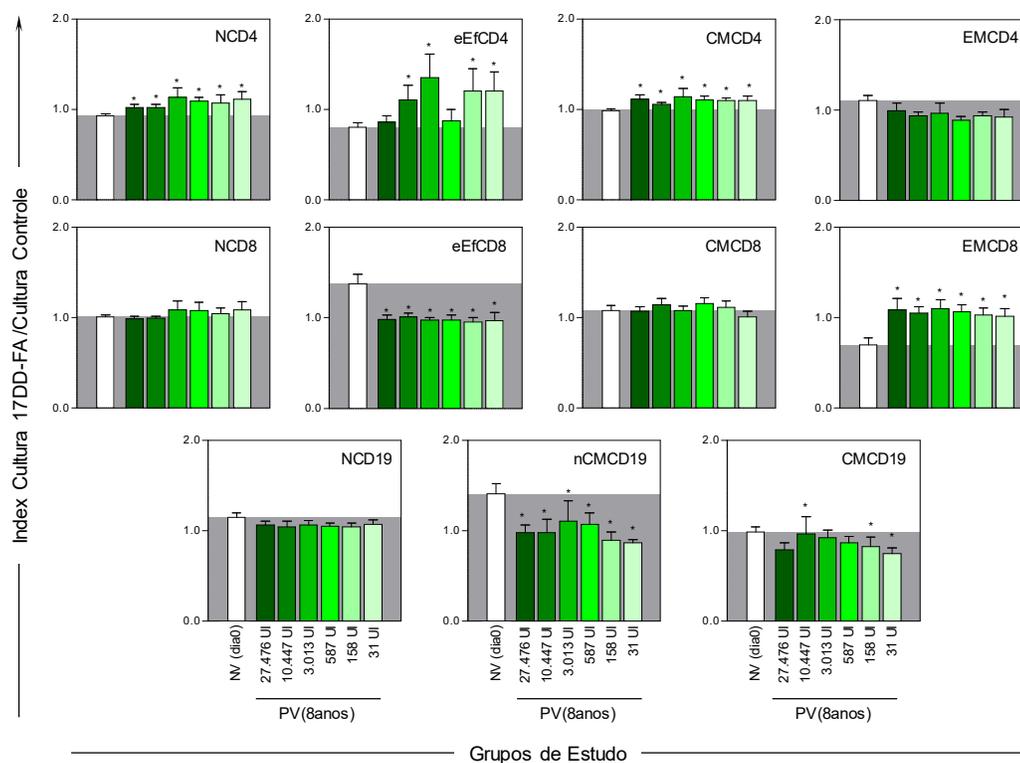


Figura 13 - Biomarcadores de memória fenotípica específica para febre amarela oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD. A memória celular fenotípica foi medida com base na expressão de marcadores de superfície após cultura *in vitro* de longa duração. Em todos os gráficos os grupos de estudos estão dispostos no eixo x, 27.476 UI, considerada a dose referência (■); 10.447 UI (■); 3.013 UI (■); 587 UI (■); 158 UI (■) e 31 UI (■); o grupo controle de indivíduos não vacinados, NV (dia0) como (□). Os resultados foram expressos em valores médios com erro padrão do index (Cultura estimulada 17DD/cultura controle). A análise comparativa de cada biomarcador entre os grupos foi avaliada por teste Mann-Whitney. Em todos os casos, diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e destacadas por asterisco (*) em comparação ao grupo não vacinado (NV (dia0)). A zona cinza representa os valores médios observados para controles não vacinados. Fonte: COSTA-ROCHA et al., 2019 (Adaptado).

De uma forma geral, não ocorreram muitas diferenças significativas entre os perfis de citocinas intracitoplasmáticas (Figura 14). As análises demonstraram baixos níveis equivalentes de IL10CD4 em todos os grupos vacinais quando comparados com o grupo controle.

Diversos perfis randômicos e pontuais foram observados: queda nos níveis de IFNCD4 para o grupo vacinal 3.013 UI, queda de IL5CD8 e de TNFCD19 e no grupo vacinal 587 UI e baixos níveis de IL5CD19 para o grupo vacinal 10.447 UI, e, sempre em comparação com o grupo de indivíduos não vacinados (Figura 14).

Figura 14 - Biomarcadores de memória funcional específica para febre amarela oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD

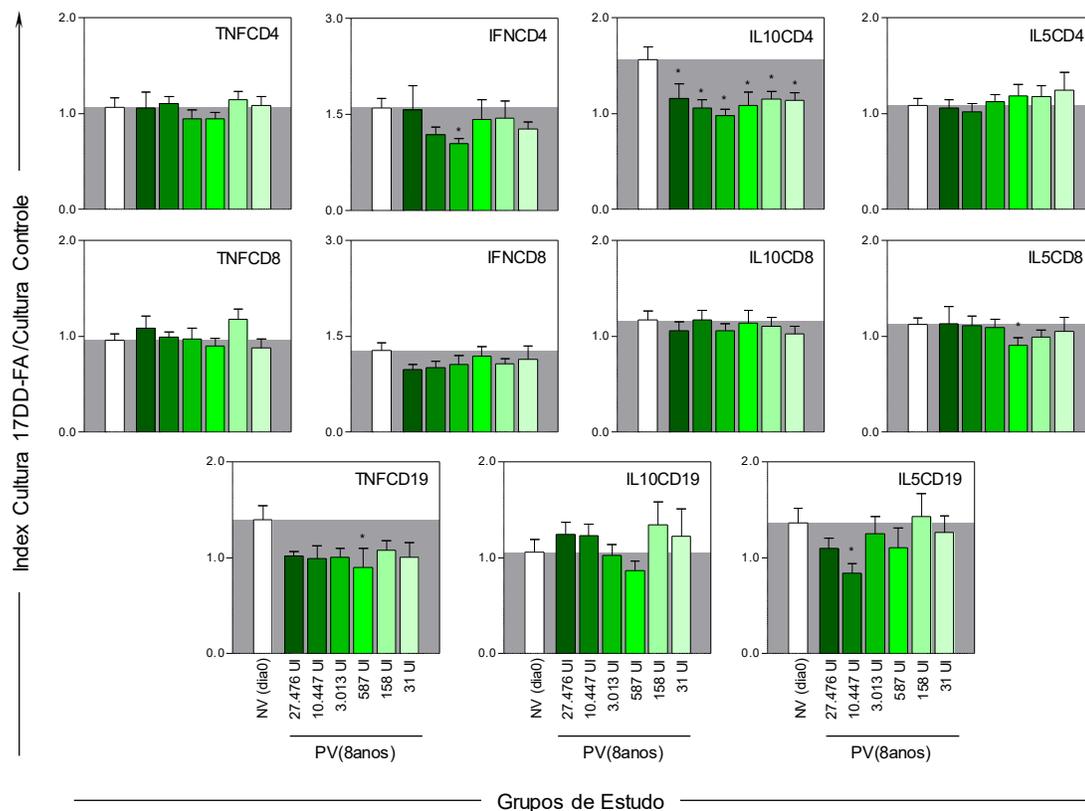


Figura 14 - Biomarcadores de memória funcional específica para febre amarela oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD. A memória celular funcional foi medida com base nos perfis de citocinas intracitoplasmáticas após cultura *in vitro* de longa duração. Em todos os gráficos os grupos de estudos estão dispostos no eixo x, 27.476 UI, considerada a dose referência (■); 10.447 UI (■); 3.013 UI (■); 587 UI (■); 158 UI (■) e 31 UI (■); o grupo controle de indivíduos não vacinados, NV (dia0) como (□). Os resultados foram expressos em valores médios com erro padrão do index (Cultura estimulada 17DD/cultura controle). A análise comparativa de cada biomarcador entre os grupos foi avaliada por teste Mann-Whitney. Em todos os casos, diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e destacadas por asterisco (*) em comparação ao grupo não vacinado (NV (dia0)). A zona cinza representa os valores médios observados para controles não vacinados. Fonte: COSTA-ROCHA et al., 2019 (Adaptado).

Em uma análise adicional de acompanhamento de oito anos utilizando doses menores da vacina 17DD, os dados deste estudo foram comparados com outros provindos de um banco de dados de um estudo realizado pelo nosso grupo, no qual os participantes receberam a dose plena (dose de rotina) da vacina 17DD (COSTA-PEREIRA et al., 2018).

Os parâmetros escolhidos para esta análise adicional foram os títulos de anticorpos neutralizantes e EMCD8, ambos importantes correlatos de proteção. Em ambos os estudos os mesmos métodos foram utilizados para quantificar tais variáveis e os resultados foram apresentados na Figura 15

A análise dos dados demonstrou que oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD, todos os indivíduos selecionados ainda apresentam níveis preservados de anticorpos neutralizantes e de memória efetora CD8⁺, sendo similares com aqueles observados nos grupos PV (30-45 dias) e PV (7-9 anos) e, de forma notável, apresentaram-se acima daqueles observados no grupo NV (dia 0) e PV (>10 anos).

Figura 15 - Duração das taxas de soropositividade e dos níveis de EMCD8 oito anos após a primovacinação com a dose de rotina e com doses menores da vacina 17DD

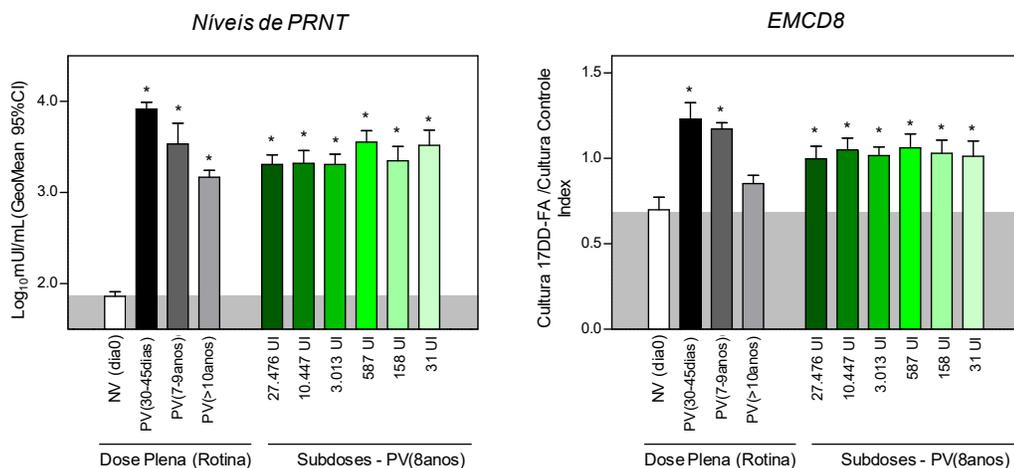


Figura 15 - Duração das taxas de soropositividade e dos níveis de EMCD8 oito anos após a primovacinação com a dose de rotina e com doses menores da vacina 17DD. O perfil específico de anticorpos neutralizantes e de EMCD8 foram comparados com aqueles encontrados em voluntários que recebem a dose plena de rotina. Os grupos que receberam a dose plena de rotina foram referidos em ambos os gráficos como: NV(dia 0) (□); PV(30-45 dias) (■); PV(7-9 anos)(■); PV(<10 anos) (■) e aqueles que foram primovacinação com doses menores da vacina 17DD como PV(year8) foram nomeados como: 27.476 UI, considerada a dose referência (■); 10.447 UI (■); 3,013 UI (■); 587 UI (■); 158 UI (■) e 31 UI (■). Os níveis de anticorpos neutralizantes foram expressos em log₁₀mUI/mL. Os níveis de EMCD8 foram apresentados como index da Cultura estimulada 17DD/cultura controle. A análise comparativa de cada biomarcador entre os grupos foi avaliada por ANOVA, ajustada para comparações múltiplas de Tukey. Em todos os casos, diferenças significativas foram consideradas quando p<0,05 e destacadas por asterisco (*) em comparação ao grupo não vacinado (NV (dia0)). A zona cinza representa os valores médios observados para controles não vacinados. Fonte: COSTA-ROCHA et al., 2019 (Adaptado).

5.5 Análise comparável de matrizes de biomarcadores oito anos após a primovacinação com doses menores da 17DD

As redes de biomarcadores foram construídas para determinar conexões entre os títulos de anticorpos neutralizantes (expressos em log₁₀ mUI/mL), o perfil fenotípico de memória celular (NCD4, eEfCD4, CMCD4, EMCD4, NCD8, eEfCD8, CMCD8, EMCD8, NCD19, nCMCD19 e CMCD19) e o perfil funcional (TNFC4,

IFNCD4, IL10CD4, IL5CD4, TNFCD8, IFNCD8, IL10CD8, IL5CD8, TNFCD19, IL10CD19 e IL5CD19). Os resultados foram apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Matrizes da rede de biomarcadores oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD

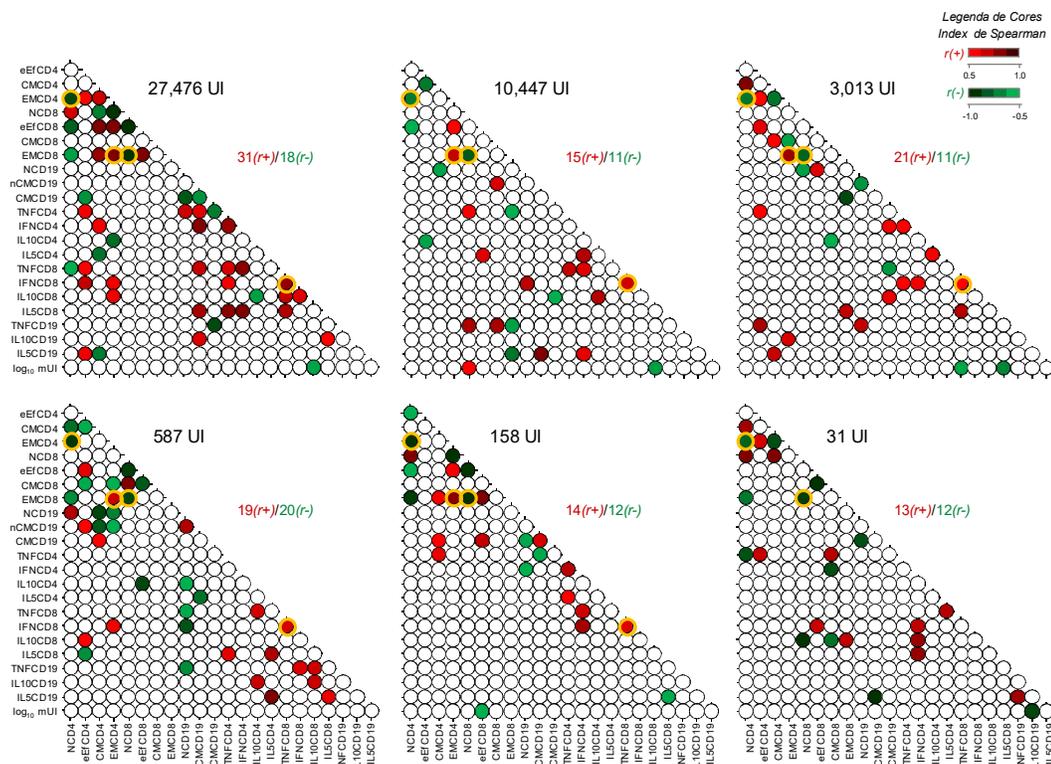


Figura 16 - Matrizes da rede de biomarcadores oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD. Foram realizadas análises de correlações para os seis grupos de acordo com a dose administrada em 2009: 27.476UI, considerada a dose de referência; 10.447 UI, 3.013UI, 587 UI, 158 UI e 31 UI. As matrizes foram montadas em um modelo pontilhado, onde cada ponto está representando um eixo de correlação entre dois atributos. Legenda de cores foi empregada para identificar índices significativos de correlação de Spearman “r” em $p < 0,05$, referidos como positivo (escala vermelha, $r (+)$ variando de 0,5 a 1,0) ou negativo (escala verde, $r (-)$ variando de -1,0 a -0,5). Correlações não significativas foram representadas por pontos brancos. A relação entre correlações positivas e negativas “ $r(+)/r(-)$ ” foi fornecida na figura. As correlações comuns entre doses distintas da vacina 17DD foram destacadas por contorno de cor laranja. Fonte: COSTA-ROCHA et al., 2019 (Adaptado).

De forma geral, existe uma predominância de correlações positivas “ $r(+)/r(-)$ ” entre os atributos dos perfis fenotípicos e funcionais da memória celular e os títulos

de anticorpos neutralizantes da imunidade humoral na maioria dos subgrupos, com altas taxas para as doses de 27.476 UI, 10.447 UI e 3.013 UI (31/18, 15/11 e 21/11, respectivamente).

Correlações negativas fortes foram observadas para “EMCD4,1/NCD4” e “EMCD8,1/NCD8” em todos os grupos, independente da dose administrada. E de forma adicional, notáveis correlações positivas foram observadas para “EMCD4,EMCD8” e “TNFCD8,IFNCD8” na maioria dos grupos, exceto para os voluntários que receberam a dose de 31UI (Figura 16).

5.6 Principais semelhanças dos perfis de memória humoral e celular específicos para febre amarela oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD

Foi realizada uma análise global de todos os resultados encontrados e uma seleção dos biomarcadores que apresentaram perfis comuns entre as diferentes doses da vacina 17DD foi compilada na Figura 17.

Imunogenicidade, memória celular fenotípica e funcional e as correlações entre os atributos foram agregados para identificar biomarcadores universais entre os grupos. Setas foram empregadas para destacar queda (↓) ou aumento (↑) quando comparados com o NV (dia0).

Figura 17 - Visão geral das principais semelhanças nos perfis de memória humoral e celular oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD

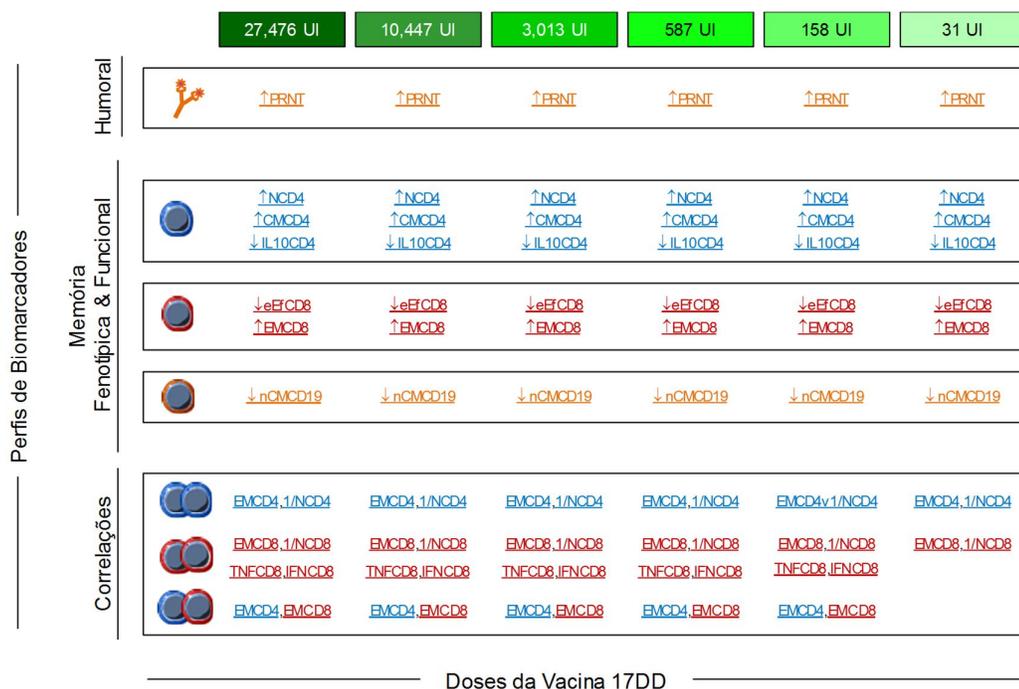


Figura 17 - Visão geral das principais semelhanças nos perfis de memória humoral e celular oito anos após a primovacinação com doses menores da vacina 17DD. Seleção de biomarcadores com perfis semelhantes entre as doses diferentes da vacina 17DD (27.476 UI - dose de referência; 10.447 UI; 3.013 UI; 5813 UI; 158 UI e 31 UI). Os títulos de anticorpos neutralizantes da memória humoral ( = PRNT) foram mensurados pelo mesmo método empregado no estudo de dose-resposta de 2009 (MARTINS et al., 2013). Os biomarcadores de memória fenotípicos e funcionais ( = NCD4, CMCD4 e IL10CD4;  = eEfCD8 e EMCD8 juntamente com  = nCMCD19) foram avaliados por cultura *in vitro* específica com antígeno vacinal 17DD, conforme descrito por Costa-Pereira e colaboradores (2018). As setas destacam queda (↓) ou aumento (↑) nos biomarcadores avaliados em comparação com NV (dia0). As análises de correlação foram realizadas para identificar atributos comuns negativos ( = "EMCD4,1 / NCD4" e  = "EMCD8,1 / NCD8") ou positivos ( = "TNFCD8, IFNCD8" e  = "EMCD4, EMCD8") entre as diferentes doses da vacina 17DD (27.476UI - dose de referência; 10.447UI; 3.013IU; 587UI; 158IU e 31IU), com exceção das correlações "TNFCD8, IFNCD8" e "EMCD4, EMCD8" que não foram observadas para a dose mais baixa (31UI). Fonte: COSTA-ROCHA et al., 2019 (Adaptado).

O compilado revelou similaridade para um conjunto de atributos (↑PRNT, ↑NCD4, ↑CMCD4, ↓IL10CD4, ↓eEfCD8, ↑EMCD8, ↓nCMCD19) entre as diferentes doses da vacina 17DD, oito anos após a primovacinação. De forma adicional, correlações negativas entre "EMCD4,1/NCD4" e "EMCD8,1/NCD8" junto com

correlação positiva para “EMCD4,EMCD8” e “TNFCD8,IFNCD8” também foram observadas.

6 DISCUSSÃO

As vacinas contra febre amarela disponíveis atualmente, para imunização ativa, são constituídas de vírus vivo atenuado. Esta abordagem também é utilizada para a produção da vacina de sarampo, rubéola e caxumba. As vacinas de vírus vivo atenuado induzem uma excelente resposta imune, podendo ser compara com a infecção com o patógeno selvagem, no entanto, uma vez atenuados, não ocorre a progressão da doença. A contínua exposição a antígenos permite que ocorra a produção de memória imunológica, levando assim a proteção.

O presente estudo é uma investigação complementar que avalia simultaneamente a duração a longo prazo da imunidade humoral e celular numa subpopulação de voluntários que receberam originalmente doses menores da vacina 17DD contra a febre amarela, envolvidos no estudo de dose reposta em 2009 (MARTINS et al., 2013).

Com exceção dos estudos realizados em função do “Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz”, existem poucos trabalhos que abordaram a duração da imunidade após imunização com doses reduzidas da vacina antiamarílica (FOX et al., 1943; FOX e PENNA, 1943; FREESTONE et al., 1977; MONATH et al., 2012). Estas pesquisas, incluíram um número relativamente pequeno de indivíduos e empregaram metodologias para a determinação da concentração viral e técnicas experimentais diferentes das de uso atual, dificultando comparações futuras. Até a publicação da OMS em 2008, não existia uma padronização na forma de expressar a concentração viral para a vacina antiamarílica, pois a relação existente entre dose letal em camundongo (do inglês, *MLD - mouse lethal dose*), unidades formadoras de placas (do inglês, *PFU- plaque forming units*) e unidades internacionais (UI) é variável. A OMS requer que as doses da vacina tenham quantidade mínima de 1000MLD₅₀ ou seu equivalente em PFU, sendo que, em 2008, foi padronizado o uso de unidades internacionais como padrão para as doses vacinais comercializadas (WHO, 2008).

Estudos sugerem que a dose vacinal pode ser muito menor do que a utilizada atualmente, induzindo títulos de anticorpos neutralizantes maiores do que os

observados em doses mais altas, provavelmente, devido a um efeito de prozona ou a outros fatores associados às doses mais altas. No entanto, estes trabalhos acabam sendo contraditórios, pois apesar de observarem títulos de anticorpos mais elevados, observam taxas de soroconversão menores (FOX e PENNA, 1943; FREESTONE et al., 1977; LOPES et al., 1988; MONATH et al., 2012).

Em um estudo recentemente publicado por Menezes Martins e colaboradores em 2018, utilizando a população do “Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz” que se iniciou em 2009, os autores demonstraram que indivíduos que foram primovacinais com a dose vacinal de 31UI, de forma inesperada, apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes mais altos em comparação aos outros grupos vacinais. Os autores hipotetizam que a causa deste fenômeno poderia ser uma seleção inadvertida de um grupo de indivíduos que biologicamente são altos respondedores à vacina antiamarílica e, portanto, poderiam responder de forma mais eficiente a uma dose mais baixa (MENEZES MARTINS et al., 2018). No entanto em estudos anteriores utilizando desta mesma população, apontam uma menor taxa de soroconversão neste mesmo grupo empregando a dose de 31U (MARTINS et al., 2013).

Em um estudo clínico de dose-resposta com vacina 17DD antiamarílica com um número mais robusto de voluntários analisados, Lopes e colaboradores (1988) avaliaram 259 indivíduos, sadios de 18 a 47 anos, inoculados com diferentes títulos do vírus vacinal 17DD (20PFU a 2000PFU). Os resultados demonstraram taxa de soroconversão de 100% (doses vacinais >200PFU) e de 93,7% para doses com títulos virais entre 100 e 200 PFU. Doses <100PFU induziram taxas de soroconversão inferiores quando comparadas com as demais doses testadas. Entretanto, o cálculo de PFU utilizado na época da realização do estudo é diferente do atual, impossibilitando assim, possíveis comparações (LOPES et al., 1988).

O “Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz” que se iniciou em 2009, avaliou os títulos de anticorpos neutralizantes em diferentes tempos após a primovacinação. No contexto de avaliação da resposta vacinal, os títulos de anticorpos neutralizantes, determinados pelo PRNT, vêm sendo considerados, de forma consensual, como “padrão ouro” para monitorar a proteção desencadeada pela vacina antiamarílica (SIMÕES et al., 2012).

Neste estudo atual, indivíduos que receberam doses de 10.447 UI até 31 UI ainda apresentam altas taxas de soropositividade (82, 83, 94, 80 e 91% nesta ordem) comparável com a encontrada na dose referência (94%). É importante mencionar que apenas voluntários que haviam soroconvertido na avaliação de 30-45 dias após a primovacinação em 2009, mantiveram a soropositividade 1 ano após e não tiveram histórico de revacinação foram incluídos na presente investigação. No entanto, a fim de superar essa limitação, a soropositividade geral de cada grupo vacinal foi calculada como uma proporção iterativa das taxas de soropositividade desde a avaliação de 30-45 dias até esta avaliação de acompanhamento de oito anos após a primovacinação. Os dados demonstraram que doses acima de 587 UI apresentaram alta imunogenicidade similar, enquanto doses de 158 UI e 31UI induziram baixas taxas de soroconversão. Isso pode estar relacionado com a alta falha primária na soroconversão, avaliada no tempo de 30-45 dias, observadas nas duas menores doses (158 UI e 31 UI) (MARTINS et al., 2013; CAMPI-AZEVEDO et al., 2014). Embora exista uma limitação do número amostral dos grupos neste trabalho, foi possível definir que essas doses foram consideradas inferiores em relação as outras doses testadas. No entanto, a taxa de soropositividade geral encontrada neste estudo (87%) foi similar a taxa encontra por Menezes Martins e colaboradores em 2018 (85%) (MENZES MARTINS et al., 2018).

Os resultados dos marcadores biológicos de memória da imunidade celular demonstram que, particularmente, EMCD8 e CMCD4, foram encontrados em níveis comparáveis entre os grupos. Isso indica que a resposta de longa duração induzida pelas doses menores da vacina 17DD baseia-se na indução de uma resposta específica e robusta de células T de memória. Esses achados corroboram com os achados por Campi-Azevedo e colaboradores (2016). Outros dados que confirmam os achados neste estudo se baseiam no fato de que as proporções biológicas de células de memória central e efetora diferem-se de acordo com populações em que são mais expressas, sendo a memória central predominante em células T auxiliares CD4⁺ e a memória efetora em linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CAMPBELL et al., 2001; MACKAY et al., 2012). Embora anticorpos neutralizantes sejam o “padrão ouro” para se avaliar a eficácia e duração da resposta vacinal antiamarílica, estudos vem comprovando o papel protetor dessas células na ausência destes anticorpos (AKONDY et al., 2017; HALSTEAD, 2017).

Já é bem conhecido o papel fundamental dos linfócitos TCD4⁺ na ativação de células B com conseqüente produção e secreção de anticorpos, sendo os linfócitos TCD4⁺ auxiliam na maturação e secreção de anticorpos com mais afinidade ao antígeno específico. Logo, a afirmação de uma resposta ótima de células T CD4⁺ de memória é extremamente importante para manter os títulos de anticorpos neutralizantes continuamente elevados (REINHARDT et al., 1998; MILLER et al., 2008; SHAW et al., 2013; CAMPI-AZEVEDO et al., 2014). De acordo com Akondy e colaboradores (2009), características específicas dos linfócitos TCD8⁺ são atributos que definem a eficácia da resposta imune após a vacinação, como: a maior magnitude, ampla especificidade, um perfil proliferativo robusto, múltipla funcionalidade e persistência a longo prazo da memória imunológica (AKONDY et al., 2009). Diversos estudos demonstram que a memória imunológica protetora desenvolvida após a vacinação antiamarílica compreende a habilidade de produzir anticorpos neutralizantes juntamente com a geração de células de memória efetora CD8⁺ (POLAND et al., 1981; REINHARDT et al., 1998; GOTUZZO et al., 2013; WHO, 2013b; WIETEN et al., 2016; COSTA-PEREIRA et al., 2018).

De maneira notável, fortes correlações positivas (“EMCD4,EMCD8” e “TNFCD8,IFNCD8”) foram observadas na maioria dos grupos vacinais, exceto no grupo que foi imunizado com a dose de 31 UI. A predominância de correlações positivas foi observada na maioria dos grupos, 8 anos após a primovacinação, com altas taxas encontradas nos grupos 27.476 UI, 10.447 UI, e 3.013 UI. De forma adicional, fortes correlações negativas (“EMCD4,1/NCD4 e “EMCD8/1NCD8”) foram observadas em todos os grupos vacinais. Estes resultados podem indicar um provável prognóstico favorável na manutenção dos processos de memória imunológica, uma vez que os níveis de células de memória podem estar crescentes enquanto o número de células *naïve* tende a ser menor após estímulo vacinal em cultura por 144 horas.

Além disso, o grande número de conectividades induzidas pela dose referência (27.476 UI) pode representar uma ativação massiva com uma ampla gama de clones celulares desencadeados pela alta concentração antigênica, bem como, por se tratar de uma vacina de vírus vivo atenuado. Apesar do número de conectividades cair significativamente em doses menores da vacina, os correlatos de proteção (anticorpos neutralizantes e EMCD8) ainda permanecem detectáveis em níveis similares entre as doses. Esses achados corroboram aqueles já descritos por

Campi-Azevedo e colaboradores (2014), nos quais similaridades foram encontradas em parâmetros imunológicos e virológicos para doses até 3.013 UI em comparação com a dose referência (27.476 UI) enquanto doses menores induzem baixa magnitude destes parâmetros (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014). Portanto, os biomarcadores associados às conexões preservadas tal como “EMCD4,EMCD8”, “TNFCD8,IFNCD8” além de “EMCD4,1/NCD4” e “EMCD8,1/NCD8”, poderiam representar relevantes eixos para garantir a imunidade protetora frente a vacinação com a 17DD.

Em um contexto geral, as maiores similaridades encontradas nos resultados deste estudo, os títulos de anticorpos neutralizantes preservados e incríveis níveis de EMCD8, são descritos como relevantes correlatos de proteção para a imunidade específica da febre amarela (COSTA-PEREIRA et al., 2018). Os níveis de anticorpos neutralizantes têm sido considerados o correlato de proteção mais conveniente para monitorar a imunogenicidade da vacinação para febre amarela. Os linfócitos TCD8⁺ tem demonstrado diversos papéis mediando a memória celular específica para o vírus da febre amarela (AKONDY et al., 2009). Focando nesses dois biomarcadores principais (anticorpos neutralizantes e EMCD8), uma análise adicional foi realizada utilizando o banco de dados deste estudo e de outro estudo conduzido pelo nosso grupo, utilizando a dose referência de rotina da vacina 17DD (COSTA-PEREIRA et al., 2018). Os resultados suportam que a utilização de doses menores da vacina 17DD todos os indivíduos selecionados, 8 anos após a primovacinação, ainda apresentam níveis preservados de correlatos de proteção.

Juntos, os achados demonstram que a duração da imunidade na vacinação de adultos com subdoses da vacina 17DD é aceitável e comparável a aquela observada para a dose plena de referência, exceto para os grupos 158 UI e 31 UI que induziram baixa proporção iterativa das taxas de anticorpos neutralizantes no decorrer do tempo. Os níveis de PRNT e as taxas de soropositividade em conjunto com o perfil de EMCD8 fornecem evidências relevantes para o suporte do uso da estratégia de dose fracionada em adultos.

Em resposta ao atual cenário da doença no mundo, a OMS propôs o uso da estratégia de dose fracionada para atingir uma cobertura vacinal adequada em locais com altos índices de circulação viral. A dose fracionada da vacina 17DD tem demonstrado ser segura e não inferior à dose padrão na indução de soroproteção (ROUKENS et al., 2008; MARTINS et al., 2013; CAMPI-AZEVEDO et al., 2014). As

taxas de soropositividade reportadas por Ahuka-Mundeke e colaboradores (2018) em uma campanha recente de vacinação usando 1/5 da dose (dose fracionada) em Kinshasa, na República Democrática do Congo, foram similares com as obtidas por Martins e colaboradores (2013) e Campi-Azevedo e colaboradores (2014), demonstrando 98% de soroconversão nos 30-45 dias após a primovacinação em indivíduos soronegativos (AHUKA-MUNDEKE et al., 2018; CASEY et al., 2019).

Não se sabe ao certo se a persistência de anticorpos a longo prazo diferirá entre a administração fracionada e a dose plena da vacina contra a febre amarela. Contudo, um estudo experimental de longo acompanhamento randomizado, controlado e, não inferior conduzido com a vacina 17D demonstrou que 1/5 da dose da vacina induziu imunidade protetora que durou por 10 anos após a vacinação (ROUKENS et al., 2018). Vale ressaltar que a OMS recomenda que a dose mínima administrada deve conter, preferencialmente, 3.000 UI/dose, mas não menos que 1.000 UI/dose e o volume mínimo de administração não deve ser inferior a 0,1mL (1/5 do volume contido no frasco) (WHO, 2016 c). Ao se tratar da dose fracionada utilizando a vacina 17DD, 1/5 da dose possui aproximadamente 6000 UI, atendendo o que é preconizado pela OMS. Os resultados encontrados pelo *“Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz”* demonstram que doses até 3.013 UI induzem imunidade protetora, por até 8 anos, de forma similar a dose padrão (MARTINS et al., 2013; CAMPI-AZEVEDO et al., 2014; MENEZES MARTINS et al., 2018; COSTA-ROCHA et al., 2019). Esses achados sugerem que a imunidade por doses fracionadas provavelmente persistirá por anos.

Uma das grandes limitações deste estudo foi a representatividade limitada dos participantes do estudo original em 2009, que por conseguinte, refletiu em todas as abordagens de seguimento, uma vez que o “n” amostral de cada grupo vacinal foi definido pelo histórico de soropositividade nos demais tempos de análises do estudo original. Essa limitação constitui-se em uma amostra populacional selecionada de jovens (média de idade de 19,4 anos) sadios e do sexo masculino. Apesar destas limitações, o presente trabalho preencheu uma lacuna de informações sobre a duração e o perfil da resposta frente a vacinação antiamarílica com doses menores da vacina, aprimorando os dados publicados anteriormente que foram utilizados para a decisão do uso da estratégia da dose fracionada (MARTINS et al., 2013;

CAMPI-AZEVEDO et al., 2014; MENEZES MARTINS et al., 2018; COSTA-ROCHA et al., 2019).

Entretanto, ainda existem outras lacunas a serem preenchidas, necessitando de novos estudos de dose resposta para que o uso universal de doses menores da vacina antiamarílica seja aplicado em populações com particularidades em seus sistemas imunes, como crianças <2 anos de idade, idosos, mulheres grávidas, bem como, pacientes imunocomprometidos. Do nosso conhecimento, estudos recentes estão sendo desenvolvidos em países da África para avaliar o uso da dose fracionada da vacina antiamarílica em crianças, adultos e indivíduos que convivem com o HIV, bem como diferentes volumes de aplicação. A limitação dos dados descritos neste estudo também não qualifica o uso da vacinação fracionada para viagens internacionais (ROUKENS et al., 2018; ROUKENS e VISSER et al., 2019).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No atual cenário alarmante da febre amarela, com a reemergência da doença em locais, historicamente, com baixa atividade de transmissão do vírus, estudos que auxiliam e fomentam novas estratégias para incrementos de melhorias nas medidas de controle se tornam imprescindíveis.

A vacina da febre amarela é a medida mais eficiente contra a febre amarela, garantindo proteção por anos. No entanto a descrição dos eventos envolvidos na resposta imune induzida pela vacina antiamarílica empregando subdoses ainda é limitada. Baseando-se na literatura disponível, avaliar a duração da imunidade após a imunização com vacina antiamarílica é uma tarefa desafiante. Este trabalho vem como pioneiro na avaliação simultânea da duração da imunidade humoral e celular no contexto da vacinação com doses menores da vacina 17DD.

8 CONCLUSÃO

O acompanhamento da população do “Estudo de dose resposta da vacina contra febre amarela 17DD produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz” demonstrou que aqueles indivíduos que alcançam a soroconversão após a primovacinação, com doses menores da vacina 17DD, e mantiveram esta resposta um ano após, ainda apresentam imunidade humoral mediada por anticorpos neutralizantes oito anos após a primovacinação. De forma complementar, podemos denotar a presença de

uma resposta imune celular persistente, incluindo perfis fenotípicos fundamentais para imunidade protetora antiamarílica (EMCD8 e CMCD4). No entanto, as doses 157 UI e 31 UI demonstraram um desempenho pouco satisfatório nas análises de seguimento da coorte, levando assim a não recomendação de sua utilização. De forma complementar, a dose 3.013 UI, se torna recomendável, uma vez que apresentou biomarcadores estáveis e persistentes em todos os tempos de avaliação. Em suma, doses menores da vacina antiamarílica 17DD, em até 10x menor que a dose de rotina, são capazes de induzir uma imunidade duradoura comparável com a induzida pela dose plena de referência. Os resultados deste estudo oferecem suporte científico para a manutenção da política de uso de dose fracionada da vacina antiamarílica 17DD em situações emergenciais, em campanhas preventivas de vacinação em massa, como medidas de controle de possíveis surtos, segundo recomendação da Organização Mundial da Saúde e do Programa Nacional de Imunizações do Brasil.

9 REFERÊNCIAS

- AHMED, Rafi; AKONDY, Rama S. Insights into human CD8(+) T-cell memory using the yellow fever and smallpox vaccines. **Immunol Cell Biol**, v. 89, n. 3, p. 340–345, 2011.
- AHMED, Qanta A.; MEMISH Ziad A. Yellow fever from Angola and Congo: a storm gathers. **Trop Doct**, v. 47, n. 2, p. 92–96, 2017.
- AHUKA-MUNDEKE, Steve et al. Immunogenicity of fractional-dose vaccine during a yellow fever outbreak - preliminary report. **N Engl J Med**, v. 381, n. 5, p. 4112–4117, 2018.
- AKONDY, Rama S. et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. **J Immuno**, v. 183, n. 12, p. 7919-7930, 2009.
- AKONDY, Rama S. et al. Initial viral load determines the magnitude of the human CD8 T cell response to yellow fever vaccination. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 112, n. 10, p. 3050–3055, 2015.
- AKONDY, Rama.S. et al. Origin and differentiation of human memory CD8 T cells after vaccination. **Nature**, v. 552, n. 7685, p. 362–367, 2017.
- ARAÚJO, Francisco Anilton A. et al. Epizootias em primatas não humanos durante reemergência do vírus da febre amarela no Brasil, 2007 a 2009. **Epidemiol Serv Saude**, v. 20, n. 4, p. 527-536, 2011.
- BANNARD, Oliver; et al. Pathways of memory CD8+ T-cell development. **Eur J Immunol**, v. 39, n.8, p. 2083–2087, 2009.
- BARBA-SPAETH, Giovanna et al. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. **J Exp Med**, v. 202, n. 9, p.179-1184, 2005.
- BARRETT, Alan D.T. et al. 17D yellow fever vaccines: new insights. A report of a workshop held during the World Congress on medicine and health in the tropics, Marseille, France, Monday 12 September 2005. **Vaccine**, v. 25, n. 15, p. 2758-2765, 2007.
- BARRETT, Alan D.T.; HIGGS, Stephen. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annu. Rev. Entomol**, v. 52, n. 1, p. 209-229, 2007.
- BARRETT, Alan D.T.; TEUWEN, Dirk E. Yellow fever vaccine—how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place?. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 3, p. 308-313, 2009.
- BARTE, Hilary et al. Yellow fever vaccine for patients with HIV infection. **Cochrane Database Syst Ver**, v. 23, n. 1, CD010929, 2014.

BENCHIMOL, Jaime Larry. Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 2001.

BLOM, Kim; et al. Temporal dynamics of the primary human T cell response to yellow fever virus 17D as it matures from an effector- to a memory-type response. **J Immunol**, v. 190, n. 5, p. 2150–2158, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 597. **Brasília: Ministério da Saúde**, 08 de Abril 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação. 2 ed. – **Brasília : Ministério da Saúde**; p. 184 (A. Normas e Manuais Técnicos), 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica – 7. ed. – **Brasília: Ministério da Saúde**; p. 816. (Série A. Normas e Manuais Técnicos), 2009.

BRASIL. Rio Grande do Sul - Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Rio Grande do Sul. Campinas - Centro de Vigilância Epidemiológica “Alexandre Vranjac”. Boletim de Atualização – Dezembro/2009. Emergências em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) de Febre Amarela Silvestre em São Paulo e no Rio Grande do Sul e a Situação Epidemiológica Atual no Brasil (2008/2009). Disponível em: http://www.saude.campinas.sp.gov.br/doencas/febre_amarela/boletim_febre_amarela_09_12_09.pdf. Acesso: 12 nov. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Nota Técnica - Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 20, n. 1, p. 101-106, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Aspectos epidemiológicos da febre amarela silvestre e a vigilância intensificada durante período de monitoramento, Brasil, 2012/2013. **Brasília : Ministério da Saúde**, v. 45n. 07, p.1-10, 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral do Programa Nacional de Imunizações. Nota Informativa: Nº 143/CGPNI/DEVIT/SVS/MS. 2014b. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/14/Nota-Informativa-143-Febre-Amarela-Site-A-a-Z.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação. 3. ed. – **Brasília : Ministério da Saúde**, p. 250, 2014c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Reemergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2014/2015: situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no período sazonal. **Brasília : Ministério da Saúde**, v. 46, n. 29, p. 1-10, 2015.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Febre Amarela. Informe Nº 43/2017: Monitoramento dos Casos e Óbitos de Febre Amarela no Brasil. **Brasília: Ministério da Saúde**. 2017b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à saúde. Boletim Epidemiológico. Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017. **Brasília : Ministério da Saúde**, v. 48, n. 28, p. 1-22, 2017c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Campanha de vacinação terá dose fracionada de febre amarela em três estados **Agência Saúde: Ministério da Saúde**. 2018. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42289-campanha-de-vacinacao-tera-dose-fracionada-de-febre-amarela-em-tres-estados>. Acesso em: 14 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Febre amarela: sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. 2019a. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao#epidemiologia>. Acesso: 10 nov. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Febre Amarela. Informe Nº 03/2018/2019: Monitoramento dos Casos e Óbitos de Febre Amarela no Brasil. **Brasília : Ministério da Saúde**. 2019b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Em 2020, Ministério da Saúde amplia público para vacinas contra febre amarela e gripe. 2019c. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/46139-em-2020-ministerio-da-saude-amplia-publico-para-vacinas-contr-febre-amarela-e-gripe>. Acesso: 09 djan. 2019.

BREUGELMANS, J.G. et al. Adverse events following yellow fever preventive vaccination campaigns in eight African countries from 2007 to 2010. **Vaccine**, v. 31, n. 14, p. 1819-1829, 2013.

BURKE, D.S.; MONATH, Thomas P. Flaviviruses. In: Bernard N Fields; David M Knipe; Peter M Howley; Diane E Griffin (Eds.), Fields virology, **Lippincott, Williams; Wilkins**, Philadelphia, p.1043-1125, 2001.

CAMACHO, Luiz Antonio B. et al. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. **Rev Saúde Públ**, v. 38, n. 5, p. 671-678, 2004.

CAMPBELL, James J. et al. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. **J. Immunol**, v. 166, n. 2, p. 877-884, 2001.

CAMPI-AZEVEDO, Ana Carolina; et al. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. **PLoS One**, v. 7, n. 12, e49828, 2012.

CAMPI-AZEVEDO, Ana Carolina et al. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 391, p. 1-12, 2014.

CAMPI-AZEVEDO, Ana Carolina et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. **Hum Vaccines Immunother**, v. 12, n. 2, p. 491-502, 2016.

CAMPI-AZEVEDO, Ana Carolina et al. Short-lived immunity after 17DD-YF single dose indicates that booster vaccination may be required to guarantee protective immunity in children. **Front Immunol**, v.10, n. 2192, p. 1-13, 2019.

CASEY, Rebecca M. et al. Immunogenicity of Fractional-Dose Vaccine during a Yellow Fever Outbreak. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 5, p. 444-454, 2019.

CAVALCANTE, Karina Ribeiro L.J.; TAUIL, Pedro Luiz. Risco de reintrodução da febre amarela urbana no Brasil. **Epidemiol Servi Saúde**, v. 26, n. 3, p. 617-620, 2017.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Yellow fever surveillance-Africa. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 31, n. 33, p. 452-453, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Adverse events associated with 17D-derived yellow fever vaccination--United States, 2001-2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 51, n. 44, p. 989-993, 2002.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation (GRADE) for Use of Yellow Fever Vaccine Booster Doses. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, v. 64, n. 23, p. 647-650, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Vector-Borne Diseases (DVBD). Transmission of Yellow Fever Virus, 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/index.html>. Acesso: 07 nov. 2019.

- CHEN, Lin H.; HOCHBERG, Natasha S. Preparing International Travelers. The Pretravel Consultation. In: BRUNETTE, Gary W. et al. *CDC Yellow Book 2020: health information for international travel*. **Oxford University Press**, 2019.
- CLEMENTS, Alan N.; HARBACH, Ralph E. History of the discovery of the mode of transmission of yellow fever virus. **J. Vector Ecol**; v. 42, n. 2, p. 208–222, 2017.
- COLIN DE VERDIERE, Nathalie et al. Immunogenicity and safety of yellow fever vaccine in HIV-1-infected patients. **AIDS**, v. 32, n. 16, p. 2291-2299, 2018.
- COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACCINES. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. **Vaccine**, v. 32, n. 39, p. 4977–4984, 2014.
- COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACCINES. Duration of immunity in recipients of two doses of 17DD yellow fever vaccine. **Vaccine**, v. 37, n. 35, p. 5129-5135, 2019.
- COSTA, Zouraide G.A. et al. Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde**, v. 2, n. 1, p. 11-26, 2011.
- COSTA-PEREIRA, Christiane et al. Multi-parameter approach to evaluate the timing of memory status after 17DDYF primary vaccination. **PLoS Neglec Trop Dis**, v. 12, n. 6, e0006462, 2018.
- COSTA-ROCHA, Ismael Artur et al. Duration of Humoral and Cellular Immunity 8 Years After Administration of Reduced Doses of the 17DD-Yellow Fever Vaccine. **Front Immunol**; v. 10, n. 1211, p. 1-11, 2019. Erratum in: **Front Immunol**, v. 10, n. 2433, p. 1-3, 2019.
- COUTO-LIMA, Dinair; et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. **Sci rep**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.
- DELVES, Peter J.; ROITT, Ivan M. The immune system. Second of two parts. **N Engl J Med**, v. 343, n. 2, p. 108-117, 2000.
- DOUAM, Florian; PLOSS, Alexander. Yellow fever virus: knowledge gaps impeding the fight against an old foe. **Trends Microbiol**, v. 26, n.11, p. 913-928, 2018.
- DUARTE-NETO, Amaro N et al. Yellow fever and orthotopic liver transplantation: new insights from the autopsy room for an old but re-emerging disease. **Histopathology**, v. 75, n. 5, p. 638-648, 2019.
- FERGUSON, Morag; HEATH, Alan. Collaborative study to assess the suitability of a candidate International Standard for yellow fever vaccine. **Biologicals**, v. 32, n. 4, p. 195-205, 2004.

FERGUSON, Morag et al. WHO Working Group on technical specifications for manufacture and evaluation of yellow fever vaccines, Geneva, Switzerland, 13–14 May 2009. **Vaccine**, v. 28, n. 52, p. 8236-8245, 2010.

FERNANDEZ-GARCIA, Maria Dolores et al. Vaccine and wild-type strains of yellow fever virus engage distinct entry mechanisms and differentially stimulate antiviral immune responses. **MBio**, v. 7, n. 1, e01956-15, 2016.

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

FOX, Jhon P. et al. Field studies of the immune response to 17D yellow fever virus. **Am J Hyg**, v. 38, n. 2, p. 113-138, 1943.

FOX, Jhon P.; PENNA, H.A. Behavior of 17D yellow fever virus in Rhesus monkeys. **Am J Hyg**, v. 38, n. 2, p. 152-172, 1943.

FREESTONE, D.S. et al. Stabilized 17D strain yellow fever vaccine: dose response studies, clinical reactions and effect on hepatic function. **J Biol Stand**, v. 5, n. 3, p. 181-186, 1977.

FREESTONE, D.S. Yellow Fever Vaccine. In: Plotkin, S.A.; Mortimer, E.A. (Eds.) Vaccines, 2ed. W.B. **Saunders Company**, Philadelphia, USA, 1994.

FREIRE, Fernanda Dias; et al. Febre amarela: uma velha doença, mas com novos desafios. **Conex Cienc**, v. 13, n. 1, p. 79-86, 2018.

GALLER R. et al. Phenotypic and a molecular analyses of yellow fever 17DD vaccine viruses associated with serious adverse events in Brazil. **Virology**, v. 290, n. 2, p. 309-319, 2001.

GARDNER Christina L.; RYMAN Kate D. Yellow fever: a reemerging threat. **Clin Lab Med**, v. 30, n. 1, p. 237-260, 2010.

GAUCHER, Denis et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. **J. Exp. Med**, v. 205, n. 13, p. 3119–3313, 2008.

GERSHMAN, Mark D.; STAPLES, J. Erin. CDC Yellow Book 2018: health information for international travel. **Oxford University Press**, 2017.

GIBNEY, Katherine B. et al. Detection of antiyellow fever virus immunoglobulin m antibodies at 3-4 years following yellow fever vaccination. **Am J Trop Med Hyg**, v. 87, n. 6, p. 1112–1115, 2012.

GOTUZZO, Eduardo et al. Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. **Am J Trop Med Hyg**, v. 89, n. 3, p. 434-444, 2013.

GROOM, Joanna R.; LUSTER, Andrew D. CXCR3 in T cell function. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 5, p. 620–631, 2011.

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. **Cien Saude Colet**, v. 8, n. 2, p. 511, 2003, (Livro de Resumos II do VII Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva, Brasília-DF, agosto de 2003).

HALSTEAD, Scott B. Achieving safe, effective, and durable Zika virus vaccines: Lessons from dengue. **Lancet Infect. Dis**; v. 17, n. 11, e378–e382, 2017.

HAYES, Edward B. Acute viscerotropic disease following vaccination against yellow fever. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 101, n. 10, p. 967-971, 2007.

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

JAMES, Eddie A. et al. Yellow fever vaccination elicits broad functional CD4+ T cell responses that recognize structural and nonstructural proteins. **J Virol**, v. 87, n. 23, p. 12794–12804, 2013.

JOHANSSON, Michael A. et al. The whole iceberg: estimating the incidence of yellow fever virus infection from the number of severe cases. **Trans R Soc Trop Med Hyg**; v. 108, n. 8, p. 482-487, 2014.

JONKER, Emile F.F. et al. Advances and controversies in yellow fever vaccination. **Ther Adv Vaccines Immunother**, v. 1, n. 4, p. 144-152, 2013.

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

KAREKO, Bettie W. et al. Persistence of Neutralizing Antibody Responses Among Yellow Fever Virus 17D Vaccinees Living in a Nonendemic Setting. **J Infect Dis**, v. 221, n. 12, p. 2018-2025, 2020.

KENGSAKUL, Kitisak et al. Fatal myeloencephalitis following yellow fever vaccination in a case with HIV infection. **J Med Assoc Thai: Chot Mai Het Thang Phaet**, v. 85, n. 1, p. 131-134, 2002.

KITCHENER, Scott. Viscerotropic and neurotropic disease following vaccination with the 17D yellow fever vaccine, ARILVAX®. **Vaccine**, v. 22, n. 17-18, p. 2103-2105, 2004.

KOHLER, Siegfried et al. The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 9, p. 2363-2373, 2012.

LEVIN, Michael L. Important Ixodid ticks: *Amblyomma* spp. In: Merck; Co., Inc, **MSD Veterinary Manual**, Kenilworth, NJ, USA, 2011.

LIBBS FARMACÊUTICA. Notícias - Ministro da Saúde inaugura nossa linha isolada. **São Paulo**, 2018. Disponível em: <https://www.libbs.com.br/noticias/ministro-da-saude-inaugura-nossa-linha-isolada/>. Acesso em: 02 fev. 2020.

LINDENBACH, Brett D.; RICE, Charles M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv Virus Res**, v. 59, p. 23-62, 2003.

LINDSEY, Nicole P. et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination 2007-13. **Vaccine**, v. 26, n. 48, p. 6077-6082, 2008.

LOPES, O.S. et al. Studies on yellow fever vaccine. III-Dose response in volunteers. **J Biol Stand**, v. 16, n. 2, p. 77-82, 1988.

LUIZA-SILVA, Maria et al. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. **J Infect Dis**, v. 204, n. 6, p. 873–883, 2011.

MACKAY, Laura K. et al. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. **Proc Natl Acad Sci**, v. 109, n. 18, p. 7037-7042, 2012.

MARQUARDT, et al. The human NK cell response to yellow fever virus 17D is primarily governed by NK cell differentiation independently of NK cell education. **J Immunol**; v. 195, n. 7, p. 3262-3272, 2015.

FUERTES MARRACO, Silvia A. Fuertes et al. Long-lasting stem cell-like memory CD8+ T cells with a naïve-like profile upon yellow fever vaccination. **Sci Trans Med**, v. 7, n. 282, 282ra48, 2015.

MARTINS, Marina A. 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**, v. 148, n. 1, p. 90-100, 2007.

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

MARTINS, Reinaldo M. et al. 17DD yellow fever vaccine: a double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. **Hum Vacc Immunother**; v. 9, n. 4, p. 879–888, 2013.

MELCHJORSEN, Jesper; SØRENSEN, Louise N.; PALUDAN, Søren R. Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function. **J Leukoc Biol**, v. 74, n. 3, p. 331–343, 2003.

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

MILLER, Joseph D. et al. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. **Immunity**, v. 28, n. 5, p. 710-722, 2008.

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

MONATH, Thomas P. Yellow Fever: Victor, Victoria? Conqueror, Conquest? Epidemics and Research in the Last Forty Years and Prospects for the Future. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 45, n. 1, p. 1-43, 1991.

MONATH, Thomas P. Yellow fever: an update. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 1, p. 11–20, 2001.

MONATH, Thomas P. et al. Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (ARILVAX and YF-VAX) in a phase III multicenter, double-blind clinical trial. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 5, p. 533-541, 2002.

MONATH, Thomas P. Yellow Fever Vaccine. **Expert Rev Vaccines**, v. 4, n. 4, p. 553-574, 2005.

MONATH, Thomas P. Yellow fever as an endemic/epidemic disease and priorities for vaccination. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 99, n. 5, p. 341-347, 2006.

MONATH, Thomas P. et al. Yellow fever vaccines. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P. Vaccines, 5th ed, **Saunders Elsevier**, China, p. 959-1055, 2012.

MONATH, Thomas P et al. Chapter 38: Yellow fever vaccine. In: Vaccines, 6th ed, Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (Eds), **Elsevier Saunders**, p.870, 2013.

MONATH, Thomas P.; VASCONCELOS, Pedro F.C. Yellow fever. **J Clin Virol**, 64:160-173, 2015.

MURRAY, Catherine L. et al. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 9, p. 699-708, 2008.

MUTEBI, John-Paul; BARRETT, Alan D.T. The epidemiology of yellow fever in Africa. **Microbe Infect**, v. 4, n. 14, p. 1459-1468, 2002.

NETTO, Isabella Pêgo Miranda et al. Perfil epidemiológico de pacientes infectados com febre amarela no município de Imbé de Minas. **Revista e-saúde casu**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2017.

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

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

NEVES, Patrícia C. et al. Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptive immune responses. **PLoS One**, v. 8, n. 12, e81953, 2013.

NIEDRIG, M et al. 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**, v. 4, n. 12, p. 867–871, 1999.

NORONHA, Tatiana Guimarães de. Duração da imunidade pós-vacinação contra febre amarela em crianças: estudo complementar sobre imunidade humoral. 2016. (Tese). **Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca.**; Rio de Janeiro, 2016.

OLIVEIRA, Consuelo; CUNHA, Juarez. Novas recomendações para a vacina febre amarela. **Sociedade brasileira de imunizações**. 2015. Disponível em: <https://sbim.org.br/images/files/novas-recomendacoes-para-a-vacina-febre-amarela-150203a.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Organização Mundial da Saúde. Folha informativa - Febre amarela, 2019. **Organização Pan-Americana de Saúde** Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5578:folha-informativa-febre-amarela&Itemid=875. Acesso: 11 nov. 2019.

ORTIZ-MARTÍNEZ, Yeimer; PATIÑO-BARBOSA, Andrés Mauricio; RODRIGUEZ-MORALES, Alfonso J. Yellow fever in the Americas: the growing concern about new epidemics. Version 2. **F1000Research**; v. 6, n. 398, 2017.

PIERSON, Theodore C et al. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. **Cell host; microbe**, v. 4, n. 3, p. 229-238, 2008.

POLAND, J. D. et al. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. **Bull World Health Organ**, v. 59, n. 6, p. 895-900, 1981.

POSSAS, Cristina et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 10, e180278, 2018.

PULENDRAN, Bali et al. Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. **Immunol Rev**, v. 255, n. 1, p. 243–255, 2013.

QUEREC, Troy 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**, v. 203, n. 2, p. 413-24, 2006.

QUEREC Troy D.; PULENDRAN Bali. Understanding the role of innate immunity in the mechanism of action of the live attenuated Yellow Fever Vaccine 17D. **Adv Exp Med Biol**, v. 590, p. 43-53, 2007.

RAMOS, Daniel Garkauskas et al. Febre Amarela. In: Bol Epidemiol. Número especial: Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. **Brasília : Ministério da Saúde**, v. 50, n.esp., p. 26-28, 2019.

RAVINDRAN, Rajesh et al. Vaccine activation of the nutrient sensor GCN2 in dendritic cells enhances antigen presentation. **Science**, v. 343, n. 6168, p. 313-317, 2014.

REINHARDT, B. et al. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. **J. Med. Virol**, v. 56, n. 2, p. 159–167, 1998.

REZENDE, Izabela Maurício et al. Late-relapsing hepatitis after yellow fever. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 222, 2020.

ROLLINS, Daniel; et al. Yellow fever. **NURSING**, v. 47, n. 9, p. 69-70, 2017.

ROMANO, Alessandro Pecego Martins et al. Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 20, n. 1, p. 101-106, 2011.

ROMANO, Alessandro Pecego Martins; et al. Yellow fever outbreaks in unvaccinated populations, Brazil, 2008–2009. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 3, e2740, 2014.

ROUKENS, Anna H. et al. Intradermally administered yellow fever vaccine at reduced dose induces a protective immune response: a randomized controlled non-inferiority trial. **PLoS One**; v. 3, n. 4, e1993, 2008.

ROUKENS, Anna H. et al. Elderly subjects have a delayed antibody response and prolonged viraemia following yellow fever vaccination: a prospective controlled cohort study. **PloS One**, v. 6, n. 12, e27753, 2011.

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

ROUKENS, Anna H.E.; VISSER, Leo G. Fractional-dose yellow fever vaccination: an expert review. **J Travel Med**, v. 26, n. 6, taz024, 2019.

SANTOS, A.P.; MATOS, et al. Detection of Th1/Th2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay. **Cytokine**, v. 42, p. 152–155, 2008.

SHAW, Albert C. et al. Age-dependent dysregulation of innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 13, p. 875-87, 2013.

SILVA, Maria Luiza et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. **Vaccine**, v. 29, n. 3, p. 583–592, 2011.

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

STAPLES, J. Erin et al. Yellow fever vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR Recomm Rep**, v. 59, n. RR-7, p. 1-27, 2010.

STAPLES, J. Erin et al. Yellow fever vaccine booster doses: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 64, n. 23, p. 647-650, 2015.

THEILER, M.; SMITH, H.H. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. **J Exp Med**; v. 65, n. 6, p. 767-86, 1937a.

THEILER, M.; SMITH, H.H. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. **J Exp Med**, v. 65, n. 6, p. 787-800, 1937b.

VALVERDE, Ricardo. Febre Amarela: Bio-Manguinhos produz até 9 milhões de doses da vacina por mês. **FIOCRUZ, Rio de Janeiro**, RJ. 2017. Disponível em : <https://portal.fiocruz.br/noticia/febre-amarela-bio-manguinhos-produz-ate-9-milhoes-de-doses-da-vacina-por-mes>. Acesso em: 21 dez. 2019.

VASCONCELOS, Pedro F.C. et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cad Saúde Pública**, v. 17, p. S155-S164, 2001a.

VASCONCELOS, Pedro Fernando C. et al. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. **J Med Virol**, v. 65, n. 3, p. 598-604, 2001b.

VASCONCELOS, Pedro F. et al. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. **Lancet**; v. 358, n. 9276, p. 91-97, 2001. Erratum in: **Lancet**, v. 358, n. 9286, p. 1018, 2001c.

VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização. **Rev Bras Epidemiol**, v. 5, n. 3, p. 244-258, 2002.

VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Yellow fever. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

VASCONCELOS, Pedro FC; MONATH, Thomas P. Yellow fever remains a potential threat to public health. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 16, n. 8, p. 566-567, 2016.

VRATSKIKH, Oksana et al. Dissection of antibody specificities induced by yellow fever vaccination. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 6, e1003458, 2013.

WAGGONER, Jesse J. et al. Yellow fever virus: Diagnostics for a persistent arboviral threat. **JCM**, v.56, n. 10, p. e00827-18, 2018.

WIETEN, Rosanne W et al. A single 17D yellow fever vaccination provides lifelong immunity; characterization of yellow-fever-specific neutralizing antibody and T-cell responses after vaccination. **PloS one**, v. 11, n. 3, e0149871, 2016.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for yellow fever vaccine: (Requirements for Biological Substances No. 3) Proposed Amendment. **Geneva: World Health Organization**, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Background paper on yellow fever vaccine. In: SAGE Working Group, editor. **Vaccine Position Papers - Weekly Epidemiological Record**, v. 19, p. 269–284, 2013a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly Epidemiological Record [full issue]. **The Weekly Epidemiological Record**, v. 35, n. 88, p. 365–380, 2013b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International travel and health. Latest updates. World – Yellow fever vaccination booster. **Geneva: World Health Organization**, 2014. Disponível em: <https://www.who.int/ith/updates/20140605/en/>. Acesso em: 14 nov. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Yellow fever vaccination requirements and recommendations; malaria situation; and other vaccination requirements. Geneva: World Health Organization. **Country list**, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. New yellow fever vaccination requirements for travelers. International travel and health – July 2016. **Geneva: World Health Organization**. 2016 a. Disponível em: <https://www.who.int/ith/updates/20160727/en/>. Acesso em 14 jan. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Yellow Fever: Strategic Response Plan - June-August 2016. **Geneva: World Health Organization**. 2016b. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246103/1/WHO-YF-ENB-16.2-eng.pdf>. Acesso em 03 dez.2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. Fractional dose yellow fever vaccine as a dose-sparing option for outbreak response: WHO Secretariat information paper. **Geneva: World Health Organization**, p 38, 2016c.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Yellow fever vaccine: WHO position on the use of fractional doses—June 2017. **Weekly Epidemiol Rec**, v. 92, n. 25, p. 345-350, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A global strategy to eliminate yellow fever epidemics (EYE) 2017–2026. **Geneva: World Health Organization**. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Yellow fever. Factsheet. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>. Acesso em: 07 nov. 2019.

10 APÊNDICE



Duration of Humoral and Cellular Immunity 8 Years After Administration of Reduced Doses of the 17DD-Yellow Fever Vaccine

OPEN ACCESS

Edited by:

Karl Ljungberg,
Karolinska Institute (KI), Sweden

Reviewed by:

Roger E. Thomas,
University of Calgary, Canada
Jorma Hinkula,
Linköping University, Sweden

Anna Helena Roukens,
Leiden University Medical
Center, Netherlands

*Correspondence:

Ana Carolina Campi-Azevedo
campiazevedo@gmail.com
Olindo Assis Martins-Filho
oassismartins@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Vaccines and Molecular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 19 March 2019

Accepted: 13 May 2019

Published: 21 June 2019

Citation:

Costa-Rocha IAd, Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhães V, Coelho-dos-Reis JG, Fradico JRB, Souza-Lopes T, Reis LR, Freire LC, Costa-Pereira C, Mambriini JvdM, Maia MdLdS, Lima SMBd, Noronha TGd, Xavier JR, Camacho LAB, Albuquerque EMd, Farias RHG, Castro TdMd, Homma A, Romano APM, Domingues CM, Martins RdM, Teixeira-Carvalho A and Martins-Filho OA (2019) Duration of Humoral and Cellular Immunity 8 Years After Administration of Reduced Doses of the 17DD-Yellow Fever Vaccine. *Front. Immunol.* 10:1211. doi: 10.3389/fimmu.2019.01211

Ismael Artur da Costa-Rocha¹, Ana Carolina Campi-Azevedo^{1*}, Vanessa Peruhype-Magalhães¹, Jordana Graziela Coelho-dos-Reis^{1,2}, Jordana Rodrigues Barbosa Fradico¹, Thalles Souza-Lopes¹, Laise Rodrigues Reis¹, Larissa Chaves Freire¹, Christiane Costa-Pereira¹, Juliana Vaz de Melo Mambriini³, Maria de Lourdes de Sousa Maia⁴, Sheila Maria Barbosa de Lima⁵, Tatiana Guimarães de Noronha⁴, Janaina Reis Xavier⁴, Luiz Antonio Bastos Camacho⁶, Elizabeth Maciel de Albuquerque⁴, Roberto Henrique Guedes Farias⁷, Thalita da Matta de Castro⁴, Akira Homma⁴, Alessandro Pecego Martins Romano⁸, Carla Magda Domingues⁸, Reinaldo de Menezes Martins⁴, Andréa Teixeira-Carvalho¹ and Olindo Assis Martins-Filho^{1*}

¹ Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-Minas, Belo Horizonte, Brazil, ² Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³ Núcleo de Estudos em Saúde Pública e Envelhecimento, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-Minas, Belo Horizonte, Brazil, ⁴ Assessoria Clínica, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵ Laboratório de Tecnologia Viroológica, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, ⁶ Departamento de Epidemiologia e Métodos Quantitativos em Saúde - Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, ⁷ Instituto de Biologia do Exército, Rio de Janeiro, Brazil, ⁸ Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Brazil

The present study aims to determine whether 17DD-YF-specific humoral and cellular immunological memory is maintained 8-years after primary vaccination with subdoses (10,447IU;3,013IU;587IU;158IU;31IU). For this purpose, this follow-up study was carried out in a subset of volunteers ($n = 98$) originally enrolled in the dose-response study in 2009 and 46 non-vaccinated controls. Our results demonstrated that vaccinees, who had seroconverted following primary vaccination and had not been revaccinated, present similar neutralizing antibodies levels and YF-specific cellular memory, particularly CMCD4 and EMCD8 as compared to the reference full dose (27,476IU). Although, PRNT seropositivity rates were similar across subgroups (94, 82, 83, 94, 80, and 91%, correspondingly), only doses above 587IU elicited similar iterative proportion of seropositivity rates, calculated as a progressive decrease on seropositivity rates along time (89, 80, 80, and 91%, respectively) as compared to 158IU and 31IU (68 and 46%, respectively). Noteworthy were the strong positive correlations (“EMCD4,EMCD8” and “TNFCD8,IFNCD8”) observed in most subdoses, except for 31IU. Major similarities underscored the preserved antibody titers and the outstanding levels of EMCD8, relevant correlates of protection for YF-specific immunity. These findings provide evidences to support the regular use of dose sparing strategy for YF vaccine in adults.

Keywords: Yellow Fever, 17DD vaccine, subdoses, neutralizing antibodies, cellular memory

INTRODUCTION

Yellow fever (YF) is a severe acute febrile infectious disease, transmitted by mosquitoes infected with a Flavivirus RNA that occurs in Latin America and Africa. The disease is more frequent in non-immunized travelers entering into YF-endemic areas and non-vaccinated young males living in YF-endemic countries due to incursions in sylvatic areas of YF viral circulation (1, 2).

YF represents a substantial risk for non-immunized travelers entering YF-endemic areas and especially to residents of YF-endemic countries (1, 2). Because there is no effective treatment for YF, the prevention by immunization is critical to reduce the risks of YF infection. The YF vaccination has been considered the most relevant and effective prophylactic measure, inducing protective immunity within 10–30 days in ~95–99% of primary adult vaccinees (1, 3, 4).

The current outbreaks of YF in Brazil and Africa (5–10) have increased the demand for YF vaccine with consequent depletion of international stockpile. In response to this scenario, the World Health Organization (WHO) has recommended the use of fractional dose strategy to prevent the YF spread (11, 12). The fractional dose vaccination is indicated only during emergency response to YF outbreaks, when the shortage of YF-vaccine production or the need for the full-dose exceeds the capacity of the global stockpile. The WHO has developed an agenda to stimulate research to address policy-relevant issues. Critical questions still remain to be answered on the immunogenicity of fractional dose in young children (<2years), pregnant women, HIV-infected subjects as well as in immunocompromised patients. Moreover, a relevant issue is whether the immune responses to fractional dose are similar in populations with environmental exposures to other flaviviruses or flavivirus vaccination. Another gap refers to the lack of information about the long-term duration of immunogenicity and effectiveness of YF fractional vaccination as compared to the full dose (13).

Currently, there are a few world producers of YF vaccine prequalified by the World Health Organization (WHO) and the increasing demand for YF vaccine has become a challenge and impacted the international YF vaccine stockpile. Approximately 450 million doses are estimated to achieve high vaccination coverage (above 80%) in areas of YF viral circulation but the annual production of YF vaccine accomplishes only 80 million doses, rendering at risk populations susceptible to the infection (14, 15). Considering the current YF epidemiological scenario worldwide, a set of measures has been proposed by the WHO to improve YF vaccine supply, including the recommendation of a dose sparing strategy, as a short-term measure (16). Roukens et al. (17) have proposed that intradermal administration of one fifth of the amount of YF vaccine results in seropositivity in all volunteers (17). In 2016, the Strategic Advisory Group of Experts (SAGE) from the WHO considered that the available evidences were sufficient to determine the use of fractional dose, as a safe and effective option for mass vaccination campaigns to control urban outbreaks in situations of YF vaccine shortage (11, 12, 17).

Previous studies carried out by the Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine (FIOCRUZ-Brazil) in 2009,

as clinical dose-response cohort investigations with the 17DD-YF vaccine (18, 19) have further contributed to support the use of lower dose of YF vaccine. Together, Martins et al. (18) and Campi-Azevedo et al. (19) demonstrated that doses above 3,013IU elicit similar levels of neutralizing antibodies, equivalent peak viremia and strong pro-inflammatory response in a similar timeline as compared to the reference full dose (27,476IU). Moreover, it was shown that the YF-specific immunity lasted up to 1-year after primary vaccination with satisfactory levels of neutralizing antibodies (18, 19).

The knowledge about the long-term duration of YF-specific immunity after primary vaccination with lower doses is crucial to support and strengthen the use of fractional dose strategy. Recently, Martins et al. (18) have evaluated the status of YF-specific immunity in those participants on the dose-response study in 2009 and demonstrated that seropositivity was maintained in 85% of vaccinees across groups that received subdoses of 17DD-YF vaccine (20). Moreover, Roukens et al. (21) have reported that intradermal administration of a one-fifth dose of 17D-YF vaccine induced a protective immune response that lasted for 10 years after vaccination (21).

The current study is a complementary investigation based on a parallel analysis of humoral and cellular immunity in a subset of volunteers originally enrolled in the dose-response study in 2009. There is no precedent follow-up study that simultaneously evaluate the long-term duration of humoral and cellular immunity upon 17DD-YF vaccination with lower doses. These findings will add new evidences to support the regular use of dose sparing strategy for YF vaccine in adults.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

The present study was designed by the Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine as an extension of the dose-response study with the 17DD YF-vaccine conducted by Bio-Manguinhos in 2009, to evaluate the YF-specific humoral and cellular immunity duration and to provide supportive evidences for the use of fractional doses. The original dose-response study carried out in 2009, when the volunteers were selected was a non-inferiority, double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety. The current investigation is a 8-years follow-up investigation that enrolled adult male army conscripts from Rio de Janeiro (a non-endemic area for YF in 2009), average age of 19.4 years old, who had received the reference full dose and subdoses of 17DD-YF vaccine during the dose-response study in 2009 (18). The target subjects were those with negative PRNT levels before vaccination in 2009 and who were not revaccinated. A total of 319 volunteers adhered to the current protocol and were eligible for the study. Exclusion criteria followed those described by Martins et al. (18), de Menezes Martins et al. (20) and briefly included: PRNT seropositivity at baseline in 2009, PRNT seronegativity at 30–45 days or 1-year upon primary vaccination and YF re-vaccination. Participants that had participated on military

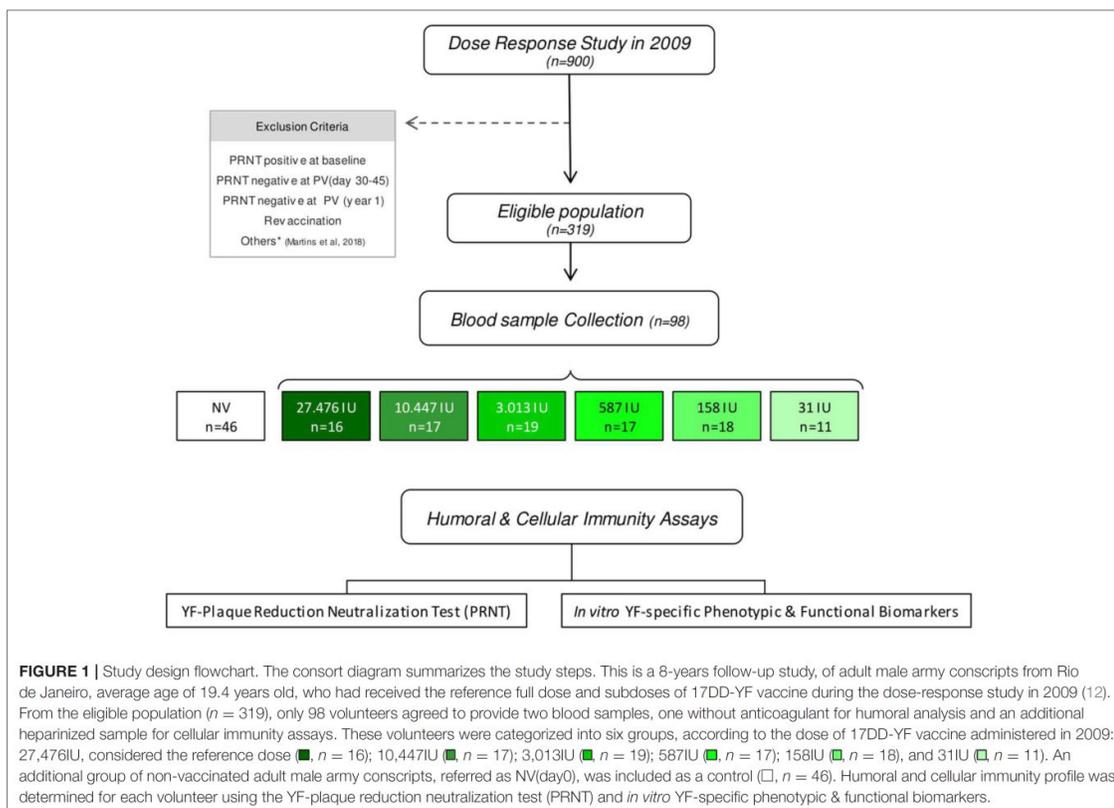
missions or traveled to sylvatic areas of YF viral circulation after 2009 were also excluded from the current investigation. Blood sampling was performed by qualified nursing team at FIOCRUZ, following informed consent and no access to additional clinical records was planned in the original study protocol. Before blood collection, participants were asked at least twice if they had been revaccinated. They were also asked to confirm that they had participated in the dose-response study in 2009. From the eligible population ($n = 319$), 98 volunteers agreed to participate in this study and were categorized into six groups, according to the dose of 17DD-YF vaccine administered in 2009: 27,476IU, considered as the reference full dose ($n = 16$); 10,447IU ($n = 17$); 3,013IU ($n = 19$); 587IU ($n = 17$); 158IU ($n = 18$) and 31IU ($n = 11$). In the original study, a single dose of 0.5 mL of 17DD-YF vaccine formulations with decreasing amounts of viral particles was given to each participant. An additional group of 46 adult male army conscripts from a database of another study carried out by our own group (22) was included as non-vaccinated controls and referred as NV (day0). Detailed compendium of the study population and methods are provided in the study design flowchart showed in the **Figure 1**.

Whole blood samples were collected from each volunteer, including 5 mL in tubes without anticoagulant for YF-plaque reduction neutralization test (PRNT) and 20 mL in heparin sodium for 17DD-YF phenotypic and functional analyses of cellular immunity profile.

This is an 8-years follow-up study included in a clinical trial registry (NCT 03338231). The study protocol was approved by the Ethics Committee at Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ (Plataforma Brasil, CAAE#65823617.6.3001.5091). All procedures followed the Helsinki Declaration, the Brazilian ethical standards of scientific research involving human subjects and the good clinical practices.

Serology for YF-Plaque Reduction Neutralizing Test (PRNT)

The PRNT levels to the 17DD-YF virus were quantified using the same method employed in the dose-response study of 2009 (18), using the same cut-off for seropositivity: $>2.7 \log_{10}$ mIU/mL (501.2 mIU/mL), or about 1/20 in dilution. The PRNT analysis was performed at Laboratório de Tecnologia Viroológica, Bio-Manguinhos (LATEV, FIOCRUZ-RJ, Brazil).



***In vitro* Assays for YF-Specific Phenotypic and Functional Memory Biomarkers**

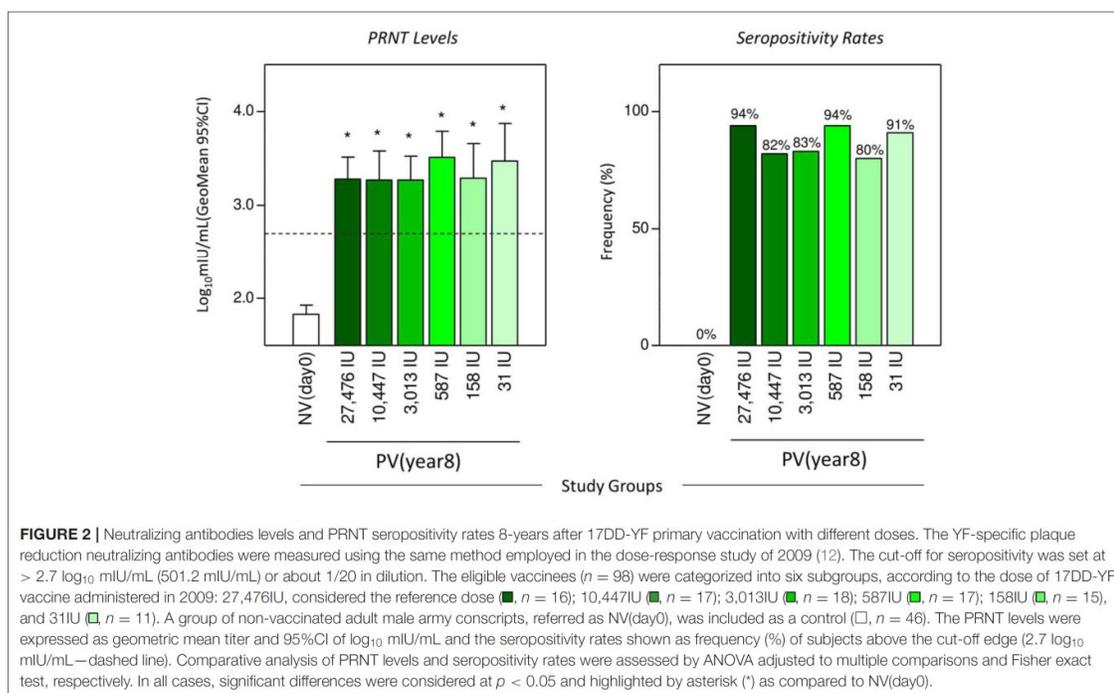
The peripheral blood lymphoproliferation assay for measuring YF-specific cellular immunity memory was performed as previously described by Costa-Pereira et al. (22). Briefly, aliquots (1.0×10^6 /well) of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were incubated in the absence (Control) or presence of 17DD-YF vaccine stimuli (17DD-YF Ag), at 37°C in a 5% CO_2 for 6 days. After incubation, PBMC were harvested and stained with live/dead dye (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and a mix of monoclonal antibodies (mAbs) [anti-CD4/(RPA-T4)/FITC; anti-CD8/(SK1)/PerCP-Cy5.5; anti-CD27/(M-T271)/PE, anti-CD45RO/(UCHL1)/PE-Cy7 and anti-CD3/(SK7)/APC-Cy7] to quantify memory T-cell subsets and [anti-CD19/(HIB19)/PerCP, anti-CD27/(M-T271)/PE and anti-IgD/(IA6-2)/FITC] for B-cell analysis. All mAbs were purchased from BD Pharmingen (BD Bioscience, San Diego, CA, USA).

Additional aliquots of cultured PBMC were labeled with live/dead dye and a cocktail of mAbs [anti-CD3/(UCHT1)/Qdot605 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); anti-CD4/(GK1.5)/APC-Fluor780 (eBioscience, San Diego, CA, USA); anti-CD8/(SK1)/PerCP (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and anti-CD19/(HIB19)/Alexa-Fluor700 (eBioscience, San Diego, CA, USA)] to identify T-cell subsets and B-cells. Following the Fix/Perm step, cells were reincubated with a mix of mAbs [anti-TNF- α /(clone MAb11)/PE-Cy7; anti-IFN- γ /(clone

B27)/Alexa-Fluor488); anti-IL-5/(JES1-39D10)/PE and anti-IL-10/(JES3-19F1)/APC, all purchased from BD Bioscience] to enumerate functional status of T and B-cells.

Stained PBMC were fixed and stored at 4°C up to 24 h prior to flow cytometric acquisition on a BD LSR Fortessa (BD Bioscience, San Diego, CA, USA).

A total of 100,000 events were acquired per each sample and data stored for offline analysis. The FlowJo software (version 9.3.2, TreeStar, San Diego, CA, USA) was employed for data analysis. The expression of CD45RO and CD27 was used to define memory CD4^+ and CD8^+ T-cell subsets: Naïve/NCD4;NCD8 - ($\text{CD27}^+\text{CD45RO}^-$); early Effector/eEfCD4;eEfCD8 - ($\text{CD27}^-\text{CD45RO}^-$); Central Memory/CMCD4;CMCD8 - ($\text{CD27}^+\text{CD45RO}^+$) and Effector Memory/EMCD4;EMCD8 - ($\text{CD27}^-\text{CD45RO}^+$). The expression of IgD and CD27 was employed to define memory B-cell subsets: Naïve/NCD19 - ($\text{CD27}^-\text{IgD}^+$); Non-classical Memory/nCMCD19 - ($\text{CD27}^+\text{IgD}^+$) and Classical Memory/CMCD19 - ($\text{CD27}^+\text{IgD}^-$). Functional CD4^+ and CD8^+ T-cell subsets (TNF- α , IFN- γ , IL-10, and IL-5) as well as B-cells (TNF- α , IL-10, and IL-5) were also quantified. The results were first generated as percentage of memory T and B-cell subsets in parallel with cytokine $^+$ -cells. The final results of YF-specific phenotypic and functional memory biomarkers were presented as 17DD-YF Ag/Control culture Index, calculated as the ratio between the percentages of cells observed in the



17DD-YF Ag cultures by percentage observed in the respective control culture.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed, first blindly, by using ANOVA adjusted to multiple comparisons and Fisher's exact test, as indicated. After code unblinding, each 17DD-YF vaccine group was compared to the control group of non-vaccinated subjects -NV(day0). The iterative proportion fitting of PRNT seropositivity rates were also calculated for comparative analysis amongst groups. In all cases, significant differences were considered at $p < 0.05$ and highlighted by asterisk (*) as compared to NV(day0).

RESULTS

Similar Immunogenicity Is Maintained 8-Years After 17DD-YF Primary Vaccination With Lower Doses

The geometric mean titers of YF-specific plaque reduction neutralizing antibodies and the frequency of seropositive vaccinees ($>2.7 \log_{10}$ mIU/mL) at 8-years upon 17DD-YF primary vaccination with different doses are presented in the **Figure 2**. The 8-years follow-up study demonstrated that volunteers, who had seroconverted upon 17DD-YF primary vaccination with lower doses and had not been revaccinated, still presented

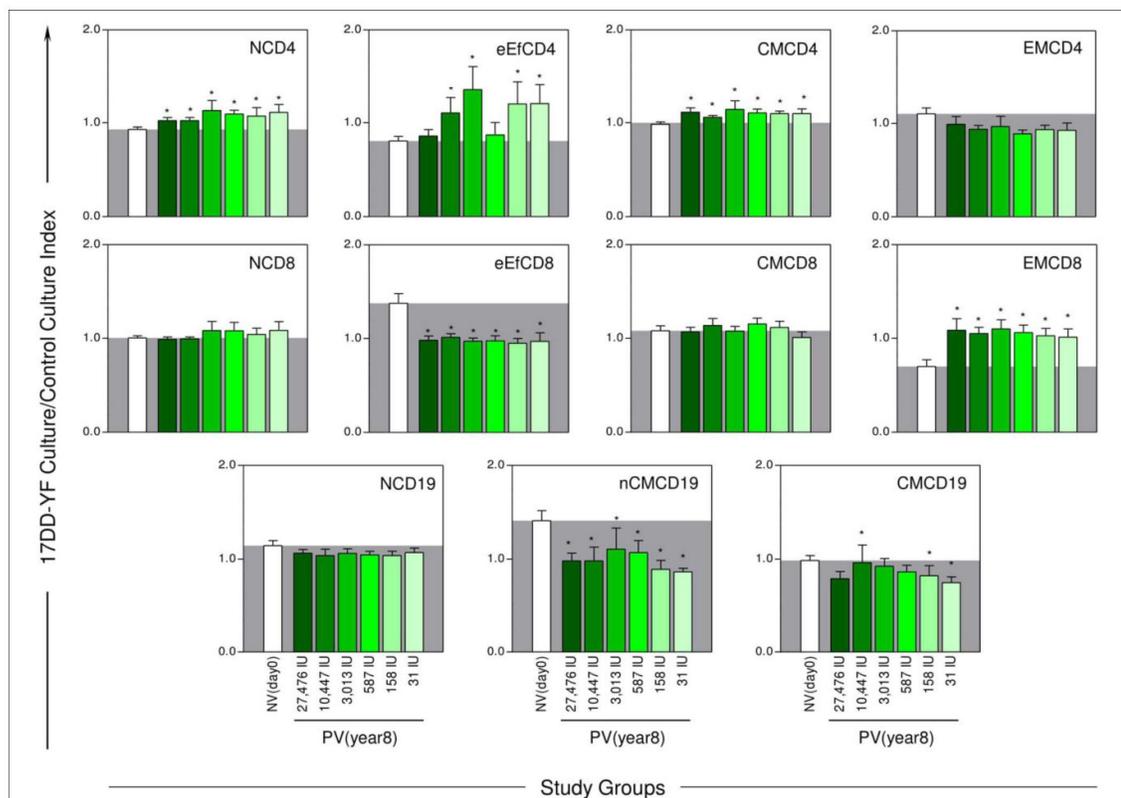
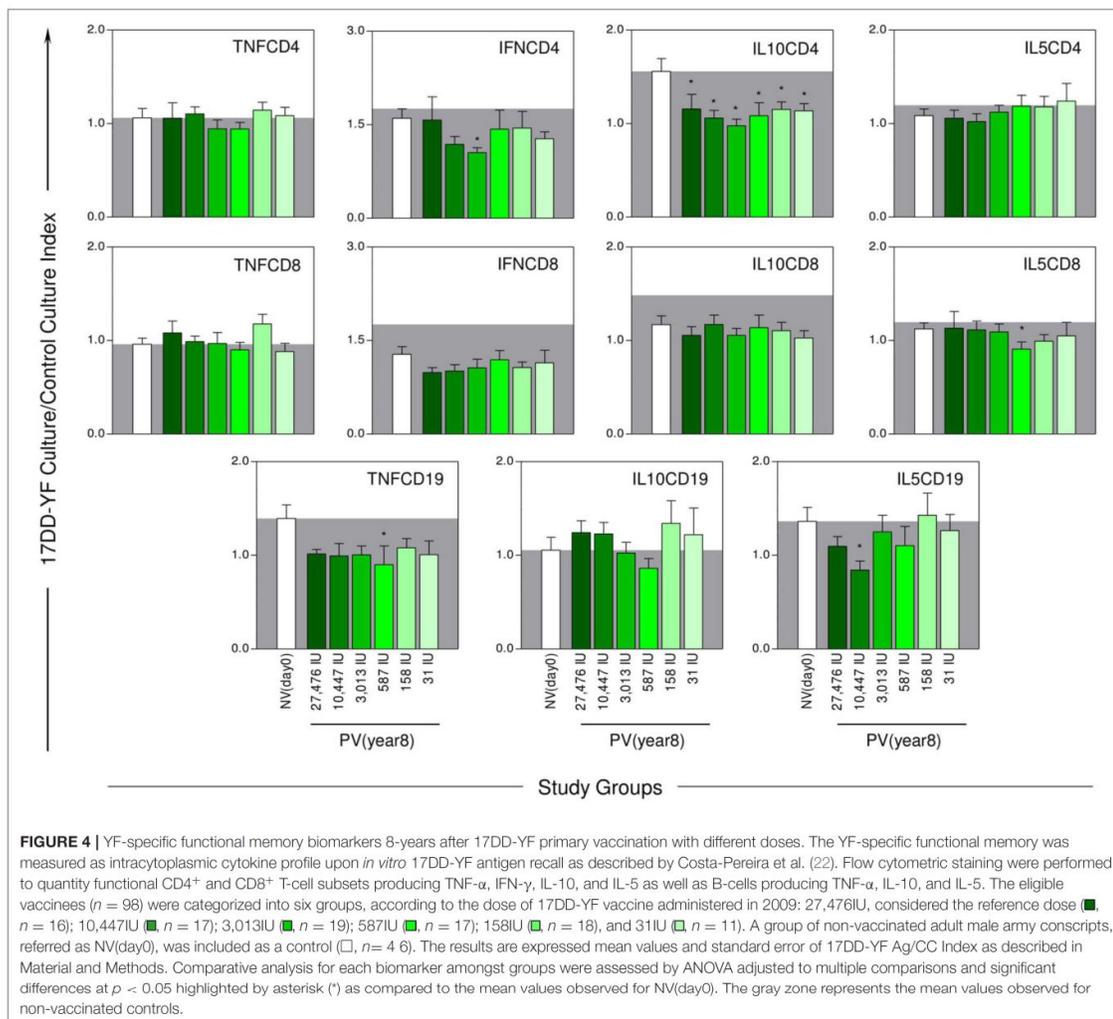


FIGURE 3 | YF-specific phenotypic memory biomarkers 8-years after 17DD-YF primary vaccination with different doses. The YF-specific phenotypic memory was measured based on cell-surface marker expression upon *in vitro* 17DD-YF antigen recall as described by Costa-Pereira et al. (22). Flow cytometric phenotypic analysis based on the expression of CD45RO and CD27 was used to define memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets: Naïve/NCD4;NCD8—(CD27⁺CD45RO⁻); early Effector/eEfCD4;eEfCD8—(CD27⁻CD45RO⁻); Central Memory/CMCD4;CMCD8—(CD27⁺CD45RO⁺) and Effector Memory/EMCD4;EMCD8—(CD27⁻CD45RO⁺). The expression of IgD and CD27 was employed to define memory B-cell subsets: Naïve/NCD19—(CD27⁻IgD⁺); Non-classical Memory/nCMCD19—(CD27⁺IgD⁺) and Classical Memory/CMCD19—(CD27⁺IgD⁻). The eligible vaccinees ($n = 98$) were categorized into six subgroups, according to the dose of 17DD-YF vaccine administered in 2009: 27,476IU, considered the reference dose (■, $n = 16$); 10,447IU (■, $n = 17$); 3,013IU (■, $n = 19$); 587IU (■, $n = 17$); 158IU (■, $n = 18$), and 31IU (■, $n = 11$). A group of non-vaccinated adult male army conscripts, referred as NV(day0), was included as a control (□, $n = 46$). The results are expressed mean values and standard error of 17DD-YF Ag/CC Index as described in Material and Methods. Comparative analysis for each biomarker amongst groups were assessed by ANOVA adjusted to multiple comparisons and significant differences at $p < 0.05$ highlighted by asterisk (*) as compared to the mean values observed for NV(day0). The gray zone represents the mean values observed for non-vaccinated controls.



similar antibody levels and seropositivity rates as in all subdoses administrated as compared to the reference full dose (Figure 2).

Aiming to determine the overall seropositivity rates achieved by the primary vaccination with lower doses of 17DD-YF vaccine, since the seroconversion at 30–45 days throughout the 8-years time span follow-up, an iterative proportion fitting of PRNT seropositivity rates was calculated as a progressive decrease on seropositivity rates along time and data presented in the **Supplementary Figure 1**. The results demonstrated that at 30–45 days, doses from 27,476IU (reference full dose) above 587IU displayed similar immunogenicity (96, 100, 97, and 97%, in that order), while doses of 158IU and 31IU induced

lower PRNT levels (89 and 56%, respectively). The 1-year follow-up included only volunteers who had seroconverted at day 30–45 after vaccination and had not been re-vaccinated. Seropositivity was maintained up to 1-year across doses (99, 97, 99, 100, and 97%, correspondingly), except for the 31IU group that led to 89% of seropositivity. The present study, carried out 8 years after primary vaccination, included only volunteers who had seroconverted at 1-year and had not been revaccinated. Subjects with negative PRNT at 30–45 days or 1-year after primary vaccination were not included in the present investigation since they were re-vaccinated as part of the study protocol approved in 2009. The results

demonstrated an overall PRNT seropositivity rate of 87%, with similar rates across groups (94, 82, 83, 94, 80, and 91%, correspondingly). However, the iterative proportion fitting of seropositivity rates demonstrated that only doses above 587IU elicited similar immunogenicity (89, 80, 80, and 91%, respectively), whereas doses of 158IU and 31IU reached lower proportion of seropositivity rates (68 and 46%, in that order) (Supplementary Figure 1).

Equivalent YF-Specific Cellular Memory Is Observed 8-Years After 17DD-YF Primary Vaccination With Lower Doses

The YF-specific phenotypic and functional memory profiles at 8-years after 17DD-YF primary vaccination with different doses are shown in the Figures 3, 4. The YF-specific memory biomarkers were assessed upon *in vitro* 17DD-YF antigen recall and the results presented as 17DD-YF Ag/Control culture Index.

Analysis of phenotypic memory biomarkers revealed, regardless of the 17DD-YF dose used at primary vaccination, higher levels of NCD4 in all vaccinees as compared to the NV(day0) control group. Conversely, lower levels of eEfCD8 and nCMCD19 were similarly observed across groups as compared to the NV(day0) control group. Waves of eEfCD4 were observed in 4 out of 5 lower doses tested (10,447IU, 3,013IU, 158IU, and 31IU). Three particular profiles were observed for CMCD19, including higher levels in 10,447IU and lower levels in 158IU and 31IU groups. Of note were the increased levels of CMCD4 and the remarkable levels of EMCD8 observed in all vaccinees even 8-years upon 17DD-YF primary vaccination with lower doses (Figure 3).

The data from the current investigation was compared with those from another study carried out by our own group, in which the participants received the “routine” full dose of 17DD-YF vaccine (13). In both studies the results were obtained using the same methods to quantify the levels of neutralizing antibodies and EMCD8. Using the combined database from both studies, the YF-specific PRNT and EMCD8 profiles were compared and the results presented in the Supplementary Figure 2. Data analysis demonstrated that 8-years after primary vaccination with 17DD-YF subdoses, all selected vaccinees still presented preserved levels of PRNT and EMCD8, similar to those observed in PV(day30–45) and PV(year7–9) but higher than that observed in NV(day0) and PV(year>10).

The analysis of functional biomarkers demonstrated equivalent lower levels of IL10CD4 across groups. Several random point profiles, such as lower levels of IL5CD19, IFNCD4 along with TNFCD19 and IL5CD8, were observed in 10,447IU, 3,013IU, and 587IU groups, respectively (Figure 4).

Together, these findings demonstrated that volunteers, who had seroconverted upon 17DD-YF primary vaccination with lower doses and had not been revaccinated, still presented in an 8-years follow-up study comparable YF-specific cellular memory, particularly CMCD4 and EMCD8 as compared to the reference full dose (Figure 3).

Comparable Biomarker Network Portrait Is Perceived 8-Years After 17DD-YF Primary Vaccination With Different Doses

Biomarker networks were built to define connections between YF-specific humoral and cellular memory at 8-years follow 17DD-YF primary vaccination with different doses (Figure 5). In general, there was a predominance of positive correlations “ $r(+)/r(-)$ ” between YF-specific humoral and cellular memory at 8-years upon primary vaccination in most subgroups, with higher ratios for doses of 27,476IU, 10,447IU, and 3,013IU (31/18, 15/11, and 21/11, respectively). Strong negative correlations were observed for “EMCD4,1/NCD4” and “EMCD8,1/NCD8” in all groups, regardless of the dose administered. Noteworthy was the strong positive correlation observed for “EMCD4,EMCD8” and “TNFCD8,IFNCD8” in most groups, except for volunteers receiving the 31IU dose (Figure 5).

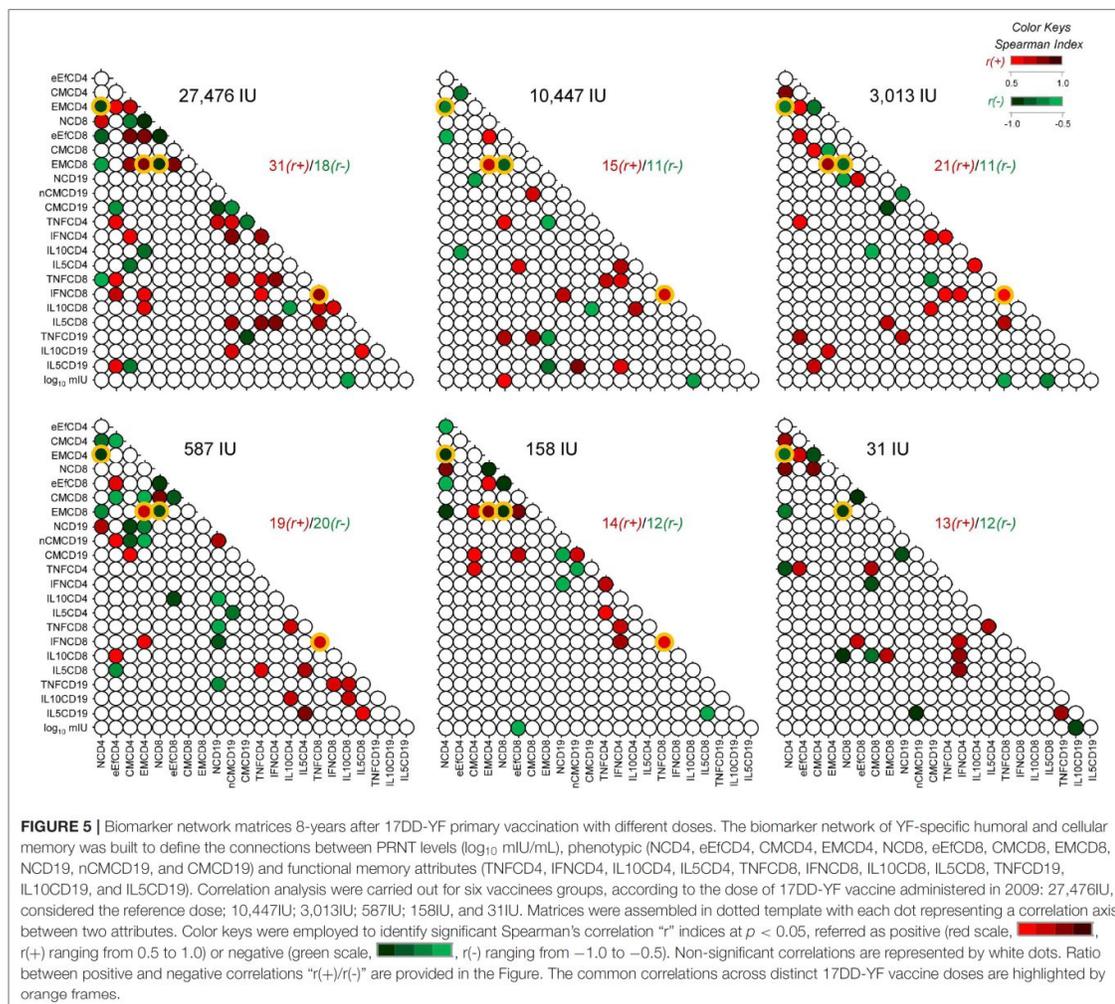
Analogous Snapshot Highlights the Major Similarities of YF-Specific Humoral and Cellular Memory Profile 8-Years After 17DD-YF Primary Vaccination With Different Doses

The selection of biomarkers presenting common profiles throughout distinct doses of 17DD-YF vaccine is compiled in the Figure 6. Humoral immunogenicity, phenotypic and functional cellular memory and correlation links between attributes were assembled to identify universal biomarkers across the groups. Arrows were employed to highlight decreased (\downarrow) or increased levels (\uparrow) as compared to NV(day0). Data analysis revealed that a range of attributes (\uparrow PRNT, \uparrow NCD4, \uparrow CMCD4, \downarrow IL10CD4, \downarrow eEfCD8, \uparrow EMCD8, \downarrow nCMCD19) presented similar profiles throughout the distinct 17DD-YF vaccine doses even 8-years after primary vaccination (Figure 6). Moreover, negative correlations between “EMCD4,1/NCD4” and “EMCD8,1/NCD8” along with positive correlation for “EMCD4,EMCD8” and “TNFCD8,IFNCD8” were also observed. Worth mentioning was the preserved PRNT titers, the gold standard to measure post-vaccination immunity to YF, and the outstanding levels of EMCD8, a relevant correlate of protection for YF-specific cellular immunity (Figure 6).

DISCUSSION

The current study is a complementary investigation that simultaneously evaluate the long-term duration of humoral and cellular immunity in a subset of volunteers originally receiving subdoses of 17DD-YF vaccine, enrolled in the dose-response study in 2009.

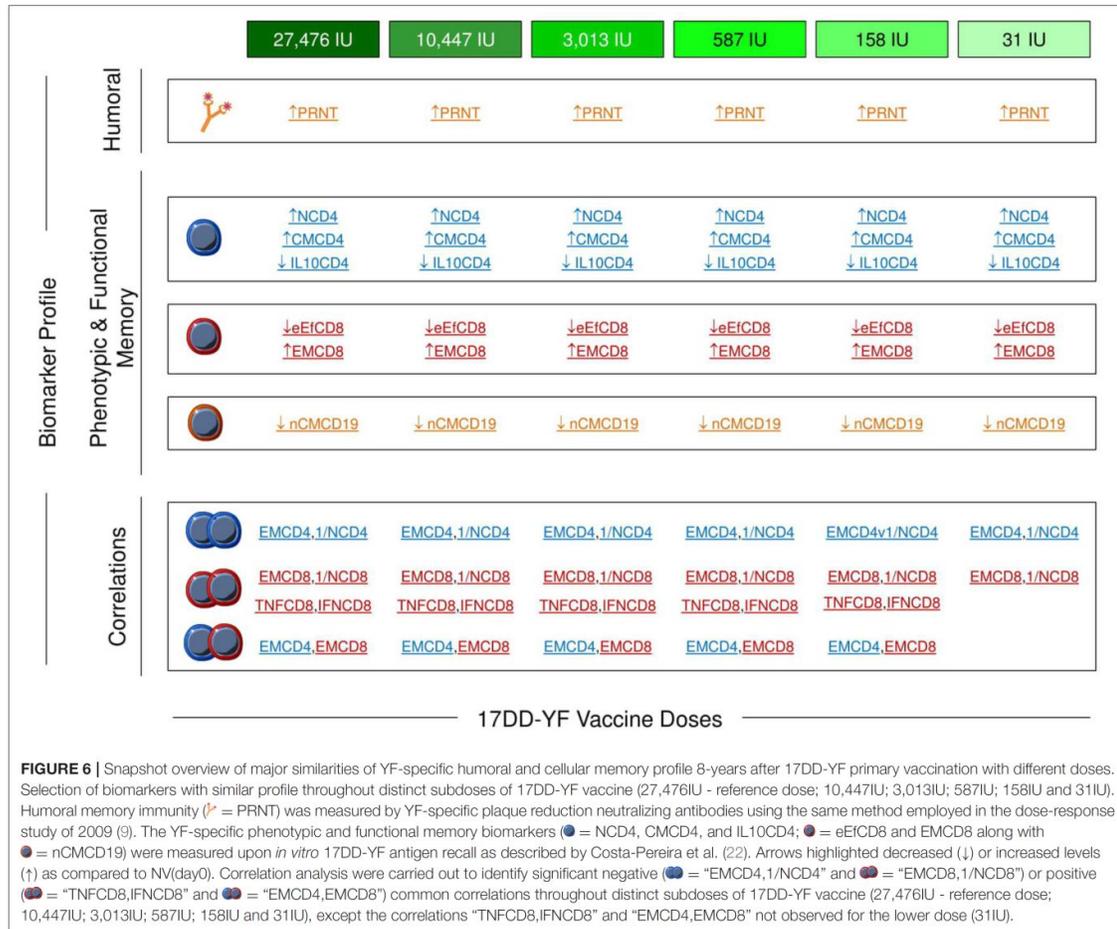
Few studies have addressed the duration of immunity after immunization with reduced doses of YF vaccine. The fractional dose of 17DD-YF vaccine has been shown to be safe and non-inferior to the standard dose in inducing seroprotection (17–19). The seropositivity rates reported by Ahuka-Mundeke et al. (23) in a recent vaccination campaign using one-fifth fractional-dose in Africa are similar to those obtained by Martins et al. (18) and



Campi-Azevedo et al. (19), showing 98% seroconversion at 30–45 days after primary vaccination in seronegative subjects (23). A long-term follow-up randomized, controlled, non-inferiority trial study conducted with the 17D-YF vaccine has shown that a one-fifth dose YF vaccine induced a protective immunity that lasted for 10 years after vaccination (21).

Recently, Martins et al. (18) have evaluated the duration of immunity by measuring neutralizing antibody levels 8-years after the dose-response study conducted in 2009 using subdoses of 17DD-YF vaccine. Seropositivity was maintained in 85% of 318 participants and was similar across groups as compared to the reference full dose. The present results demonstrated that, after 8-years, subjects who had seroconverted after 17DD-YF primary vaccination still presented an overall seropositivity rate of 87%, similar to that observed by Martins et al. (18).

Vaccinees who received doses from 10.447IU down to 31IU still presented high seropositivity rates (82, 83, 94, 80, and 91%, in that order) comparable to that reported for the reference full dose (94%). It is important to mention that only volunteers who had seroconverted at 30–45 days after primary vaccination in 2009 and maintained the seropositivity at 1-year with no records of revaccination have been included in the present investigation. However, in order to overcome this putative drawback, the overall seropositivity has been calculated as iterative proportion fitting of PRNT seropositivity rates since the seroconversion at 30–45 days throughout the 8-years time span follow-up. The data demonstrated that doses higher than 587IU displayed similarly high immunogenicity while doses of 158IU and 31IU induced lower PRNT levels. Which was a direct reflection of the higher failure of primary seroconversion at 30–45 days observed for the



two lowest doses (158IU and 31IU) (18, 19). Therefore, these doses should be considered inferior to the other doses tested.

The results also pointed out that biological markers of memory for cellular immunity, particularly EMCD8, were found in comparable levels across groups. Noteworthy was the strong positive correlations ("EMCD4,EMCD8" and "TNFCD8,IFNCD8") observed in most subdoses, except for 31IU. A predominance of positive correlations between YF-specific humoral and cellular memory was observed in most groups at 8-years upon primary vaccination, with higher ratios found for doses 27,476IU, 10,447IU, and 3,013IU. Moreover, the high number of connectivity triggered by the reference full vaccine dose (27,476IU) may represent the massive activation of a wide range of cell clones elicited by the high antigenic concentration. Although the number of connectivity drops significantly in lower YF vaccine doses, the correlates of protection (PRNT and EMCD8) still remains detectable in similar levels across all doses. These findings

allude to those previously reported by Campi-Azevedo et al. (19) that higher similarities in immunological and virological parameters were found for subdoses down to 3,013IU as compared to the reference full dose (27,476IU), while lower subdoses elicited an impaired magnitude of equivalence. Therefore, the biomarkers associated the preserved connections such as "EMCD4,EMCD8", "TNFCD8,IFNCD8" besides "EMCD4,1/NCD4" and "EMCD8,1/NCD8" might represent relevant axis to guarantee the protective immunity upon 17DD-YF vaccination.

Major similarities underscored the preserved PRNT titers and the outstanding levels of EMCD8, relevant correlates of protection for YF-specific immunity. The neutralizing antibodies levels have been considered the convenient proxy correlate of protection to monitor the immunogenicity of YF vaccination (3). Several studies have demonstrated that neutralizing antibodies and YF-specific CD8⁺ T-cell are relevant imprints of immunological memory induced by YF vaccination

(22, 24–28). The protective immune memory developed after YF vaccination comprises the ability to produce YF-neutralizing antibodies together with the generation of effector memory CD8⁺ T-cell. The high magnitude, broad specificity, robust proliferative profile, multiple functions and long-term persistence of immune memory mediated by CD8⁺ T-cells is an attribute that defines efficacious immune response after vaccination (29). Focusing on these two premium biomarkers (PRNT and EMCD8), an additional analysis was performed using a combined database from the current investigation and from another study of our own group using the “routine” full dose of 17DD-YF vaccine (22). The results further supports that 8-years after primary vaccination with 17DD-YF subdoses all selected vaccinees still presented preserved levels of correlates of protection.

Together, the current findings demonstrated that the duration of immunity upon vaccination of adults with subdoses of 17DD-YF vaccine is acceptable and comparable with that observed for the reference full dose, except for 158IU and 31IU groups that elicited lower iterative proportion of PRNT seropositivity rates along time. The PRNT levels and seropositivity rates along with the profile of EMCD8 provide relevant evidences to support the use of dose sparing strategy for YF vaccine in adults.

Dose-response studies are still required for its universal use in children <2-years of age, elderly, pregnant women as well as immunocompromised patients considering the particularities of their immune response. Of our knowledge, recent studies are currently under investigation in Africa to evaluate fractional dose YF vaccination in children, adults and HIV-infected subjects. A dose-response study in children has been considered by our group and has being submitted for evaluation. The limited data on duration of protection also does not qualify people for international travel under the International Health to receive fractional dose vaccination.

DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the **Supplementary Files**.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of Brazilian ethical standards of scientific

research involving humans and the good clinical practices with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Ethics Committee at Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ (Plataforma Brasil, CAAE#65823617.6.3001.5091).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AC-A, MM, LC, RF, RM, AH, AR, CD, AT-C, and OM-F: designing research study. RM, OM-F, AR, and CD: funding acquisition. IC-R, AC-A, VP-M, JC-d-R, JF, TS-L, LR, LF, CC-P, SL, AT-C, and OM-F: conducting experiments. MM, TN, JX, EA, RF, and TC: field study. AC-A, VP-M, JC-d-R, JF, and SL: acquiring data. IC-R, AC-A, LF, JM, AT-C, and OM-F: analyzing data. TN, JX, EA and TC: validation. RM and AH: advisory committee. IC-R, AC-A, JC-d-R, CC-P, LR, JM, AT-C and OM-F: writing the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by a grant from Wellcome Trust (grant#206523/Z/17/Z) and Programa Nacional de Imunizações (PNI/SVS), Ministério da Saúde do Brasil (Fundo Nacional da Saúde, TED 205/2017, 29/12/2017). The research was also supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Biomanguinhos/FIOCRUZ, PROEP/CPqRR/FIOCRUZ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-RPT-FIOCRUZ for using the flow cytometry facilities. The authors acknowledge the Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou - FIOCRUZ Minas, supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Programa PRINT-FIOCRUZ-CAPES. LC, OM-F, AT-C received PQ fellowships from CNPq.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01211/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Douam F, Ploss A. Yellow fever virus: knowledge gaps impeding the fight against an old foe. *Trends Microbiol.* (2018) 26:913–28. doi: 10.1016/j.tim.2018.05.012
- Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol.* (2015) 64:160–73. doi: 10.1016/j.jcv.2014.08.030
- Collaborative Group for Studies on Yellow Fever Vaccines. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine.* (2014) 32:4977–84. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.07.021
- Campi-Azevedo AC, Costa-Pereira C, Antonelli LR, Fonseca CT, Teixeira-Carvalho A, Villela-Rezende G, et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Hum Vaccines Immunother.* (2016) 12:491–502. doi: 10.1080/21645515.2015
- World Health Organization. Data From: In Disease Outbreak News - Yellow fever – Republic of the Congo. (2018). Available online at: <https://www.who.int/csr/don/7-september-2018-yellow-fever-congo/en/> (accessed February 2019).
- The Lancet. Yellow fever: a major threat to public health. *Lancet.* (2018) 391:402. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30152-1
- Almeida MA, Dos Santos E, da Cruz Cardoso J, da Fonseca DE, Noll CA, Silveira VR, et al. Yellow fever outbreak affecting Alouatta populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul

- State), 2008-2009. *Am J Primatol.* (2012) 74:68–76. doi: 10.1002/ajp.21010
8. Romano APM, Costa ZGA, Ramos DG, Andrade MA, Jayme VdS, Almeida MA, et al. Yellow fever outbreaks in unvaccinated populations, Brazil, 2008–2009. *PLoS Neglect Trop Dis.* (2014) 8:e2740. doi: 10.1371/journal.pntd.0002740
 9. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. *Data From: Reemergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2014/2015: Situação Epidemiológica e a Importância da Vacinação Preventiva e da Vigilância Intensificada no Período Sazonal.* Boletim Epidemiológico Volume 46 N° 29 (2015) Available online at: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/19/2015-032---FA-ok.pdf>.
 10. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. *Data From: Emergência Epidemiológica de Febre Amarela no Brasil, no Período de Dezembro de 2016 a Julho de 2017.* Boletim Epidemiológico Vol. 48 - N° 28 (2017) Available online at: http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/06/2017_027.pdf
 11. World Health Organization. *Data From: Lower Doses of Yellow Fever Vaccine Could be Used in Emergencies.* (2016). Available online at: <https://www.who.int/en/news-room/detail/17-06-2016--lower-doses-of-yellow-fever-vaccine-could-be-used-in-emergencies> (accessed February 2019).
 12. World Health Organization. *WHO Secretariat Information Paper: Fractional Dose Yellow Fever Vaccine as a Dose-Sparing Option for Outbreak Response.* (2016). Available online at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246236/WHO-YF-SAGE-16.1-eng.pdf>
 13. Vannice K, Wilder-Smith A, Hombach J. Fractional-Dose yellow fever vaccination - advancing the evidence base. *N Engl J Med.* (2018) 379:603–5. doi: 10.1056/NEJMp1803433
 14. Wilder-Smith A. Yellow fever vaccination: estimating coverage. *Lancet Infect Dis.* (2017) 17:1109–11. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30494-2
 15. Shearer FM, Moyes CL, Pigott DM, Brady OJ, Marinho F, Deshpande A, et al. Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. *Lancet Infect Dis.* (2017) 17:1209–17. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30419-X
 16. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Bio-Manguinhos. *Data From: Vacina de Febre Amarela de Bio Ajuda a Combater Epidemia em Angola.* (2016). Available online at: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/noticias/1218-vacina-de-febre-amarela-de-bio-ajuda-a-combater-surto-em-angola> (accessed February 2019).
 17. Roukens AH, Vossen AC, Bredenbeek PJ, van Dissel JT, Visser LG. Intradermally administered yellow fever vaccine at reduced dose induces a protective immune response: a randomized controlled non-inferiority trial. *PLoS ONE.* (2008) 3:e1993. doi: 10.1371/journal.pone.0001993
 18. Martins RM, Maia MdeLS, Farias RHG, Camacho LAB, Freire MS, Galler S, et al. 17DD yellow fever vaccine: a double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. *Hum Vacc Immunother.* (2013) 9:879–88. doi: 10.4161/hv.22982
 19. Campi-Azevedo AC, Estevam PdeA, Coelho-dos-Reis JG, Peruhype-Magalhães V, Villela-Rezende G, Quaresma PF, et al. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. *BMC Infect Dis.* (2014) 14:391. doi: 10.1186/1471-2334-14-391
 20. de Menezes Martins R, Maia MLS, de Lima SMB, de Noronha TG, Xavier JR, Camacho LAB, et al. Duration of post-vaccination immunity to yellow fever in volunteers eight years after a dose-response study. *Vaccine.* (2018) 36:4112–7. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.041
 21. Roukens AHE, van Halem K, de Visser AW, Visser LG. Long-Term protection after fractional-dose yellow fever vaccination: follow-up study of a randomized, controlled, noninferiority trial. *Ann Internal Med.* (2018) 169:761–5. doi: 10.7326/M18-1529
 22. Costa-Pereira C, Campi-Azevedo AC, Coelho-Dos-Reis JG, Peruhype-Magalhães V, Araújo MSS, do Vale Antonelli LR, et al. Multi-parameter approach to evaluate the timing of memory status after 17DD-YF primary vaccination. *PLoS Neglect Trop Dis.* (2018) 12:e0006462. doi: 10.1371/journal.pntd.0006462
 23. Ahuka-Mundeye S, Casey RM, Harris JB, Dixon MG, Nsele PM, Kizito GM, et al. Immunogenicity of fractional-dose vaccine during a yellow fever outbreak - preliminary report. *N Engl J Med.* (2018) 36:4112–7. doi: 10.1056/NEJMoal710430
 24. Gotuzzo E, Yactayo S, Cordova E. Review article: efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. *Am J Trop Med Hygiene.* (2013) 89:434–44. doi: 10.4269/ajtmh.13-0264
 25. World Health Organization. Background paper on yellow fever vaccine. In: SAGE Working Group, editor. *Vaccine Position Papers - Weekly Epidemiological Record.* Geneva: SAGE Working Group (2013). p. 269–84.
 26. 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.
 27. 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 Organiz.* (1981) 59:895–900.
 28. Wieten RW, Jonker EF, van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Ten Berge IJ, de Visser AW, et al. A Single 17D Yellow fever vaccination provides lifelong immunity; characterization of yellow-fever-specific neutralizing antibody and t-cell responses after vaccination. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0149871. doi: 10.1371/journal.pone.0149871
 29. 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) 183:7919–30. doi: 10.4049/jimmunol.0803903
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2019 Costa-Rocha, Campi-Azevedo, Peruhype-Magalhães, Coelho-dos-Reis, Fradico, Souza-Lopes, Reis, Freire, Costa-Pereira, Mambrini, Maia, Lima, Noronha, Xavier, Camacho, Albuquerque, Farias, Castro, Homma, Romano, Domingues, Martins, Teixeira-Carvalho and Martins-Filho. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.*