

Carolina Argondizo Correia

Avaliação da resposta imune humoral em indivíduos imunizados com a vacina atenuada
YFV 17DD em vigência de infecção natural pelo vírus da febre amarela

São Paulo

2024

Carolina Argondizo Correia

Avaliação da resposta imune humoral em indivíduos imunizados com a vacina atenuada
YFV 17DD em vigência de infecção natural pelo vírus da febre amarela

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

São Paulo
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Argondizo Correia, Carolina

Avaliação da resposta imune humoral em indivíduos imunizados com a vacina atenuada YFV 17DD em vigência de infecção natural pelo vírus da febre amarela / Carolina Argondizo Correia. -- São Paulo, 2024.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.Febre amarela 2.Vacinação
3.Anticorpos 4.Anticorpos neutralizantes 5.Carga viral 6.Filogenia

USP/FM/DBD-017/24

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta tese a todos os indivíduos que corajosamente enfrentaram a febre amarela, seja no laboratório na busca pelo seu entendimento, seja no próprio corpo, tentando combater uma infecção ainda sem cura. Essa é a minha pequena contribuição nesta longa e incessante batalha por conhecimento e pelo alívio do sofrimento.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador, Dr Esper G. Kallás, que me permitiu entrar para o seu grupo e ser sua orientanda. Ele me introduziu não só ao mundo da febre amarela, mas também da pesquisa voltada para o bem-estar dos pacientes e de toda a população. Obrigada por sempre apoiar as minhas ideias, me dar liberdade para fazer os experimentos que eu quisesse testar e sugerir hipóteses para desenvolver o trabalho. É uma honra e um orgulho tê-lo como orientador e poder acompanhar todo o seu trabalho em prol da saúde pública e cuidado com os pacientes durante os tempos mais difíceis. É uma fonte de inspiração, como pesquisadora, ver que o trabalho que fazemos na bancada está intrinsecamente relacionado com a qualidade de vida das pessoas, e aprendi com ele a não perder isso de vista. Muito obrigada por tudo, por mim e por toda a sua contribuição para a ciência no Brasil.

Agradeço igualmente ao “grupo acadêmico”, Cássia, Juliana, Priscilla, Mateus, Mariana, Carol Soares, Victória, Thais, Mônica, Anne, Luan, Ariane, Amanda e Andrea, pela convivência por todos esses anos, pela ajuda mútua neste e em vários outros projetos, pelas risadas e pelo companheirismo que foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

Um obrigada especial vai para a Cássia, Juliana e Priscilla, pela mentoria, pela ajuda e acolhimento nos momentos mais difíceis, e pelas conversas e risadas de todo dia. A Priscilla me guiou logo nos primeiros dias no laboratório, a Juliana me ensinou tudo o que eu sei de cultura celular e biologia molecular, a Cássia estava sempre disposta a discutir meu projeto e todas as ideias que surgiam pelo caminho, e as três estavam sempre ali, me motivando, fazendo experimentos comigo, me incentivando a ir sempre mais longe. Não tenho palavras para descrever a importância que vocês tiveram na minha vida.

Outro agradecimento especial não pode deixar de ir para os “*yellow-fevers*” Mariana e Mateus, companheiros de doutorado desde o começo e irmãos científicos. Agradeço tanto pela amizade, pelo apoio nos dias bons e especialmente nos dias muito ruins, pelas risadas, conversas sérias e conversas para trazer aquela leveza, ajuda com os experimentos, discussões científicas e por me trazer para a real quando eu precisava! Esse trabalho não existiria sem vocês.

Agradeço às professoras Geórgia Freitas e Camila Malta Romano e ao professor Jean Pierre Schatzmann Peron pelas contribuições valiosas e rica discussão no Exame de Qualificação.

À Dra Myrna Bonaldo, que me recebeu no seu laboratório e me permitiu aprender muito sobre ensaios com vírus. À Lidiane que me ensinou todas as metodologias, à Leda que

me auxiliou muito com os sequenciamentos dos vírus e as análises, e ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus da Fiocruz, que me ajudou muito e me recebeu muito bem no Rio de Janeiro.

Ao Issler, Renan, Beatriz, Ariane e Cândida, por todo o auxílio com as questões burocráticas e financeiras do laboratório.

Ao pessoal da prestação de serviços, Helena, Claudinha, Angélica, Bete, Raíssa, Yasmine, Beto, Eric, Aline, por todo o apoio operacional no laboratório e pela convivência diária.

Ao Alvino, que lá em 2017 me atendeu quando fui voluntária do estudo da Vacina da Dengue, por ter me apresentado ao Dr Esper e me trazer para o grupo.

À Eleni, secretária da pós-graduação, por toda a ajuda com as questões burocráticas da pós e sua paciência e proatividade para nos ajudar sempre que precisamos.

Ao Eder e a Ruth, por todo o cuidado com o laboratório e amizade ao longo desse tempo. Ao Eder em especial, pelos livros, cafés, chocolates e risadas que deixavam os dias muito mais leves.

Ao Luiz, *in memoriam*, amigo e colega de febre amarela que trabalhou conosco no começo, e que infelizmente nos deixou muito cedo, mas com uma contribuição inestimável no combate à COVID-19. Sua força de vontade e seu trabalho duro no cuidado com os pacientes mostra como sempre foi comprometido com a saúde das pessoas e é muito gratificante poder dizer que já trabalhei com ele. Obrigada pela sua paixão pela ciência, Luiz.

À Alexandra Elbakian, do Sci-Hub, pela sua luta incessante pelo livre acesso à ciência.

Agradeço aos meus pais, Beatriz e Nelson, por todo o apoio desde sempre. Obrigada por acreditarem em mim quando quis fazer ciência, obrigada por valorizarem a pesquisa brasileira, e por sempre tomarem vacinas! Amo vocês.

Agradeço ao meu irmão João e à minha cunhada Bianca, pela amizade, pela convivência, pelo suporte e pelas noites de jogos de tabuleiro para desanuviar.

Ao meu companheiro Giancarlo, que eu tenho a alegria de compartilhar a vida desde quando era apenas uma jovem estudante de Farmácia, e desde então quantas coisas passamos juntos. Várias pós-graduações, mudanças de área, de casa, viagens, alegrias e tristezas, mas sempre lado a lado. Você me ajudou não só na vida e no suporte com as minhas escolhas, como na minha própria tese, ajudando a discutir resultados e trazendo uma visão de fora que muitas vezes fez toda a diferença. Obrigada por tudo, e por sempre fazer a diferença por mim.

Por fim, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento

001, e por isso também agradeço à CAPES pelo financiamento à minha pesquisa durante o doutorado.

“Dias inteiros de calma, noites de ardência, dedos no leme e olhos no horizonte, descobri a alegria de transformar distâncias em tempo. Um tempo em que aprendi a entender as coisas do mar, a conversar com as grandes ondas e não discutir com o mau tempo. A transformar o medo em respeito, o respeito em confiança. Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.”

Amyr Klink (Cem dias entre céu e mar)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras	13
Lista de tabelas	15
Lista de abreviaturas e siglas	16
Resumo	19
Abstract	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Febre Amarela.....	21
1.1.1 Histórico.....	21
1.1.2 Epidemiologia.....	23
1.1.3 Manifestações clínicas.....	29
1.1.4 Diagnóstico.....	30
1.1.5 Tratamento.....	32
1.1.6 Vacinação.....	33
1.2 Vírus da febre amarela.....	37
1.2.1 Visão geral.....	37
1.2.2 Análise molecular.....	39
1.3 Resposta imune do hospedeiro.....	41
1.3.1 Visão geral.....	41
1.3.2 Anticorpos neutralizantes e proteína E.....	45
1.4 Justificativa.....	48
2. OBJETIVOS.....	50
2.1 Objetivo geral.....	50

2.2 Objetivos específicos.....	50
3. MÉTODOS.....	51
3.1 Aprovação ética para a realização da pesquisa.....	51
3.2 Coortes e amostras biológicas.....	51
3.2.1 Voluntários infectados.....	51
3.2.2 Voluntários sem infecção (grupo controle).....	53
3.2.3 Coleta e processamento das amostras.....	53
3.3 Quantificação de anticorpos totais circulantes.....	54
3.4 Ensaio <i>in vitro</i>	55
3.4.1 Células.....	55
3.4.2 Meios de cultura e reagentes.....	55
3.4.3 Controle de qualidade das culturas celulares.....	55
3.4.4 Cepas virais.....	56
3.4.5 Preparo dos estoques virais.....	56
3.4.6 Titulação dos estoques virais.....	57
3.4.7 Ensaio de neutralização por citometria de fluxo.....	58
3.5 Detecção do RNA viral.....	60
3.6 Sequenciamento viral.....	61
3.7 Análise das sequências virais.....	62
3.8 Análise dos resultados.....	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.1 Coorte.....	64
4.1.1 Dados demográficos gerais.....	64

4.1.2 Indivíduos vacinados (grupo IV).....	71
4.2 Avaliação da resposta humoral.....	74
4.2.1 Quantificação de anticorpos totais.....	74
4.2.2 Detecção de anticorpos neutralizantes.....	79
4.3 Carga viral.....	87
4.4 Análise molecular e filogenética.....	90
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
6. CONCLUSÕES.....	99
ANEXOS.....	100
REFERÊNCIAS.....	105
APÊNDICES.....	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos ciclos de transmissão do vírus da febre amarela.....	24
Figura 2. Áreas de circulação do YFV entre seres humanos no mundo.....	25
Figura 3. Série histórica do número de casos de febre amarela no Brasil.....	27
Figura 4. Municípios brasileiros com casos de febre amarela em seres humanos e/ou primatas não-humanos, de julho de 2014 a junho de 2020.....	28
Figura 5. Estágios clínicos da febre amarela.....	29
Figura 6. Janelas para diagnóstico de febre amarela, de acordo com o tempo decorrido após o início dos sintomas.....	31
Figura 7. Estrutura geral dos orthoflavivírus.....	38
Figura 8. Representação esquemática da estratégia de replicação de um orthoflavivírus.....	39
Figura 9. Correlatos de proteção contra vacina 17D da febre amarela.....	44
Figura 10. Cinética da resposta imune a partir da vacinação com vacina atenuada contra a febre amarela.....	45
Figura 11. Estrutura da proteína do envelope (E) dos orthoflavivírus.....	46
Figura 12. Cinética da carga viral e resposta humoral na infecção pelo vírus da febre amarela selvagem.....	47
Figura 13. Esquema de coleta de amostras de pacientes com infecção pelo vírus da febre amarela e os testes realizados nos determinados pontos no tempo.....	52
Figura 14. Relação entre a vacinação, dias de sintomas e detecção da viremia em indivíduos infectados e vacinados.....	71
Figura 15. Linhas do tempo dos pacientes que receberam a vacina contra a febre amarela e contraíram a doença silvestre.....	73
Figura 16. Cinética de anticorpos totais em pacientes infectados com o vírus da febre amarela.....	75

Figura 17. Gráficos de correlação entre título de anticorpos totais.....	76
Figura 18. Quantificação de anticorpos totais em pacientes infectados com o vírus da febre amarela.....	78
Figura 19. Cinética e <i>fold change</i> da quantificação de anticorpos totais em indivíduos infectados pelo vírus da febre amarela e vacinados com a formulação YFV 17DD.....	79
Figura 20. Estratégia de análise para visualização de células 4G2 ⁺ APC ⁺	81
Figura 21. Representação dos dados obtidos após ensaio de neutralização por citometria de fluxo (FNT) com YFV 17DD e plasma de paciente infectado com YFV selvagem.....	82
Figura 22. Comparação da resposta de anticorpos neutralizantes contra a cepa vacinal YFV 17DD.....	83
Figura 23. Comparação da resposta de anticorpos neutralizantes contra a cepa selvagem YFV ES-504.....	84
Figura 24. Comparação da resposta de anticorpos neutralizantes contra as cepas YFV 17DD e ES-504.....	85
Figura 25. Comparação da resposta de anticorpos neutralizantes em diferentes tempos de vacinação, em relação à data de início dos sintomas.....	86
Figura 26. Carga viral estimada por qPCR dos indivíduos infectados com YFV...	89
Figura 27. Representação da carga viral (CV) em log PFU/mL de indivíduos infectados com o vírus selvagem da febre amarela e vacinados com a formulação 17DD.....	90
Figura 28. Captura de tela com exemplo de trecho de alinhamento múltiplo de sequências de YFV provenientes de diversas fontes públicas.....	92
Figura 29. Árvore filogenética com sequências de YFV selvagens e vacinais.....	93
Figura 30. Árvore filogenética com sequências isoladas a partir de quadro de doença viscerotrópica.....	94
Figura 31. Árvore filogenética com sequências de YFV provenientes de diferentes regiões do país.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Padronização do intervalo de coleta de amostras biológicas conforme o número de dias após início dos sintomas.....	52
Tabela 2. Faixa de concentração da curva padrão dos anticorpos IgM e IgG.....	54
Tabela 3. Informações demográficas e dados clínicos sobre a coorte de pacientes infectados com febre amarela.....	65
Tabela 4. Comparação entre os grupos infectados pelo vírus da febre amarela, com e sem vacinação, em relação ao desfecho da doença (sobrevivência ou óbito).....	68
Tabela 5. Descrição dos grupos utilizados para os ensaios de neutralização.....	80
Tabela 6. Informações referentes às amostras de plasma de pacientes infectados pelo YFV que foram sequenciadas.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD	Ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose
ALT	Alanina aminotransferase
APC	Célula apresentadora de antígeno, do inglês <i>antigen-presenting cell</i>
AST	Aspartato aminotransferase
C	Proteína do capsídeo
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAPPESQ	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
COVID-19	Do inglês, <i>coronavirus disease 2019</i>
D	Dias após o início dos sintomas
DC	Célula dendrítica, do inglês <i>dendritic cell</i>
DENV	Vírus da dengue, do inglês <i>dengue virus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
E	Proteína do envelope
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção por ligação de enzima, do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FACS	Separação celular ativada por fluorescência, do inglês <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FNT	Teste de neutralização por separação celular ativada por fluorescência, do inglês <i>fluorescence-activated cell sorting neutralization assay</i>

FSC	Dispersão para a frente, do inglês <i>forward scatter</i>
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IU	Unidade internacional, do inglês <i>international unit</i>
IL	Interleucina
INV	Indivíduos infectados não vacinados
IV	Indivíduos infectados vacinados
LD50	Dose letal 50%, do inglês <i>lethal dose 50%</i>
LNI	Índice de neutralização em log, do inglês <i>log neutralization index</i>
NK	Célula assassina natural, do inglês <i>natural-killer cell</i>
NS	Proteína não-estrutural, do inglês <i>non-structural protein</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Quadro de leitura aberta, do inglês <i>open reading frame</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PNH	Primata não-humano
prM	Proteína pré-membrana
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa, do inglês <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RCF	Força centrífuga relativa, do inglês <i>relative centrifugal force</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave, do inglês <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF	Fator de crescimento transformador, do inglês <i>transforming growth factor</i>
Th	Linfócito T auxiliar, do inglês <i>T helper cell</i>
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumoral necrosis factor</i>
TLR	Receptor do tipo Toll, do inglês <i>toll-like receptor</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTR	Região não traduzida, do inglês <i>untranslated region</i>
YFV	Vírus da febre amarela, do inglês <i>yellow fever virus</i>
ZIKV	Vírus zika, do inglês <i>zika virus</i>

RESUMO

Argondizo Correia C. Avaliação da resposta imune humoral em indivíduos imunizados com a vacina atenuada YFV 17DD em vigência de infecção natural pelo vírus da febre amarela [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

A febre amarela é uma doença viral aguda, que acomete seres humanos e é caracterizada por sua gravidade e elevada taxa de mortalidade. Ela possui evolução rápida e até o momento não possui tratamentos específicos aprovados, porém é prevenível com vacinação. A vacina é composta pelo vírus da febre amarela (YFV, do inglês *yellow fever virus*) vivo atenuado, disponível na formulação YFV 17DD no Brasil, e uma dose é capaz de induzir anticorpos neutralizantes, detectáveis a partir de 10 dias após a vacinação até muito anos subsequentes à sua administração. Entre os anos de 2016 e 2019, o YFV passou a circular em regiões brasileiras que não eram consideradas endêmicas e, por consequência, onde a vacina não era recomendada. Nessa época, os governos locais organizaram campanhas para imunizar a população, ainda que a circulação do vírus selvagem já estivesse vigente. Isso fez com que alguns indivíduos fossem expostos aos vírus selvagem e atenuado vacinal ao mesmo tempo, sendo que em alguns casos houve desenvolvimento da doença clínica pelo vírus selvagem mesmo com o relato de vacinação recente, fato que até o momento não havia sido descrito na literatura. Como a vacinação produz potente resposta de anticorpos neutralizantes e previne infecção pelo YFV, mas ao mesmo tempo é composta por uma cepa atenuada com diferenças genéticas em relação à cepa selvagem, esse trabalho teve por objetivo avaliar o impacto da imunização recente nos indivíduos que desenvolveram quadro clínico de febre amarela, em relação à sua resposta humoral, à diversidade viral plasmática e à evolução e desfecho da doença. Para tanto, foram realizados ensaios quantitativos para a avaliação de anticorpos totais e neutralizantes contra as cepas selvagem e vacinal do YFV, bem como análise da viremia, sequenciamento viral e análise de prontuários médicos. Os indivíduos que foram vacinados e infectados simultaneamente não apresentaram diferença na quantificação de anticorpos totais em relação ao grupo infectado sem vacina, no entanto eles apresentaram maior título de anticorpos neutralizantes específicos para a cepa vacinal ($p = 0,0270$), sugerindo uma resposta específica para a vacina. Ainda, o grupo que recebeu a vacina teve taxa de letalidade muito menor (11%) do que os pacientes infectados sem o imunizante (46%). Pelas análises da carga viral e filogenia não foi possível identificar a cepa vacinal, não havendo traços de recombinação ou troca de material genético com a cepa selvagem. Em conjunto, nossos dados indicam que a vacinação com YFV 17DD em estágios iniciais da infecção pelo YFV selvagem direcionou a geração de anticorpos neutralizantes específicos para a cepa vacinal mesmo sob a prevalência do vírus selvagem na circulação. Esse fato foi observado em casos que apresentaram melhora do desfecho clínico da doença, sugerindo que a aplicação da vacina YFV 17DD em um contexto de recém-infecção pode funcionar como um reforço para a resposta imune humoral e ser considerada como uma estratégia de prevenção de casos graves de febre amarela.

Palavras-chave: Febre Amarela. Vacinação. Anticorpos. Anticorpos neutralizantes. Carga viral. Filogenia.

ABSTRACT

Argondizo Correia C. Evaluation of the humoral immune responses among individuals with 17DD yellow fever vaccination during wild-type yellow fever virus infection [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2024.

Yellow fever is an acute viral disease that affects humans and is characterized by its severity and high mortality rate. It progresses quickly and there are no specific approved treatments, but it is preventable with vaccination. The vaccine is composed of the live attenuated yellow fever virus (YFV), available in the YFV 17DD formulation in Brazil, and one dose can induce neutralizing antibodies, detectable from 10 days after vaccination until many years following the administration. Between 2016 and 2019, YFV began to circulate in Brazilian regions that were not considered endemic and, consequently, where the vaccine was not recommended. At that time, local governments organized campaigns to immunize the population, even though the wild-type virus was already circulating. This caused some individuals to be exposed to the wild-type and the attenuated vaccine viruses at the same time, and in some cases, they developed clinical disease induced by the wild-type virus even with the report of recent vaccination, a fact that had not been described to date. As vaccination produces a potent neutralizing antibody response and prevents YFV infection, but at the same time is composed of an attenuated strain with genetic differences in relation to the wild-type strain, this work aimed to evaluate the impact of recent immunization on individuals who developed clinical symptoms of yellow fever, regarding the humoral response, plasmatic viral diversity and the progression and outcome of the disease. To this end, quantitative tests were carried out to evaluate total and neutralizing antibodies against wild-type and vaccine YFV strains, as well as analysis of viremia, viral sequencing, and analysis of medical records. Individuals who were vaccinated and infected simultaneously showed no difference in the quantification of total antibodies in relation to the infected group without vaccine, however they presented a higher neutralizing antibodies' titre that were specific to the vaccine strain ($p = 0.0270$), suggesting a response promoted by the YFV 17DD. Furthermore, the group that received the vaccine had a much lower fatality rate (11%) than patients infected without the vaccine (46%). By analysing the viral load and phylogeny, it was not possible to identify the vaccine strain, as there were no traces of recombination or exchange of genetic material with the wild-type strain. Taken together, our data indicate that vaccination with YFV 17DD at early stages of wild-type YFV infection directed the generation of specific neutralizing antibodies to the vaccine strain even under the prevalence of wild-type virus in the circulation. This was observed in cases that showed an improvement in the clinical outcome of the disease, suggesting that the application of the YFV 17DD vaccine in a context of recent infection can act as a reinforcement for the humoral immune response and be considered as a case prevention strategy against severe yellow fever.

Keywords: Yellow fever. Vaccination. Antibodies. Neutralizing antibodies. Viral load. Phylogeny.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Febre Amarela

1.1.1 Histórico

A febre amarela é considerada uma das doenças humanas mais letais a atingir a população ocidental do mundo no século XIX^a (1,2). É uma doença viral, causada pelo vírus da febre amarela (YFV, do inglês *yellow fever virus*), e sua história está intrinsecamente relacionada com a história da virologia e medicina, uma vez que o YFV foi o primeiro patógeno viral humano isolado experimentalmente (3).

Análises do genoma viral indicam que o vírus evoluiu no continente africano (2), porém o primeiro relato conhecido do que seria um quadro clínico de febre amarela aparece em um manuscrito Maia de 1648, que descreve indivíduos sofrendo de hematêmese, um vômito preto ou *xekik*^a (1). A rota do vírus para as Américas se deu provavelmente entre os séculos XVI e XIX, durante o tráfico de pessoas escravizadas vindas do continente africano (4). Nos navios, acredita-se que os ovos de mosquitos contaminados ficavam depositados em barris de água e eclodiam em poucos dias. Ao realizarem o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado, os mosquitos podiam carregar e transmitir o vírus por até 12 dias, e como as viagens marítimas da época podiam durar meses, isso significa que ao longo delas podiam ser geradas diversas gerações de mosquitos infectados. Quando os navios atracavam em um novo local, os artrópodes eram então liberados naquele ambiente e se estabeleciam no novo ecossistema (5). Dessa maneira, diversas epidemias aconteceram em todo o continente, em especial nas regiões portuárias (6).

Durante os séculos XVIII e XIX ocorreram as piores epidemias de febre amarela em cidades americanas, ocasionando a morte de milhares de pessoas (6). Na época, a doença era popularmente conhecida como o “mal amarelo” ou “*yellow Jack*” devido à icterícia pronunciada apresentada pelos doentes, que desenvolviam quadros de febre hemorrágica com altas taxas de mortalidade (6). O termo “febre amarela” surgiu em 1750, quando Griffin Hughes utilizou o nome para descrever a doença na obra “História Natural dos Barbados”^b (6).

^a Monath, T. P. in *Microbe Hunters — Then and Now* (eds Oldstone, M. & Koprowski, H.) 95–111 (Medi-Ed, Bloomington, Illinois, 1996 apud (1)).

^b Strode GK, editor. *Yellow fever*. New York: McGraw Hill Book Company Inc.; 1951 apud (6).

A febre amarela não somente causou problemas sanitários, mas também alterou o rumo da sociedade da época, afetando diretamente a política e a economia dos locais nos quais se instalava. Alguns exemplos são o surto de 1793 na Filadélfia, na época a capital dos Estados Unidos da América (EUA), que dizimou 10% da população e causou a mudança da capital do país para um local mais afastado do litoral (5,6), e os milhares de casos que aconteceram durante a construção do canal do Panamá, no fim do século XVIII, levando os trabalhadores franceses envolvidos a abandonar as obras (7). Foi somente no início do século seguinte, com a descoberta do vetor da doença, que os EUA elaboraram estratégias para o seu controle, com conseqüente diminuição do número de casos da doença. Assim, eles assumiram a obra e inauguraram o canal em 1914 (8).

Apesar dos relatos antigos sobre a doença e seu impacto na vida e na sociedade humanas por mais de 200 anos, a etiologia da febre amarela e o modo de transmissão do YFV permaneceram desconhecidos por muito tempo. Pouco se sabia sobre a doença, apenas que era endêmica nas regiões tropicais das Américas e África, e que também causava graves epidemias em países da Europa como Espanha, França, Inglaterra e Itália, durante o século XIX (6). Nesta época, os vírus ainda não tinham sido descobertos e não havia doenças descritas com artrópodes como vetores. Um inseto como potencial transmissor foi sugerido pela primeira vez pelo médico norte-americano Josiah Clark Nott, em 1848 e, em 1881, o médico cubano Carlos Finlay sugeriu o gênero *Aedes* como o vetor (9), ao verificar que a ocorrência de surtos nos Estados Unidos diminuía na época de seca dos pântanos, quando também havia redução do número de mosquitos (5). Para testar sua teoria, ele capturou mosquitos e os deixou ingerir sangue de pacientes com sintomas de febre amarela. Depois, expôs homens saudáveis a estes mosquitos e, para a sua surpresa, 20% deles desenvolveram quadros leves de febre amarela. No ano seguinte, ele apresentou um artigo com as suas conclusões (10), que na ocasião não foram aceitas pela comunidade científica. Apenas 20 anos depois, com a descoberta de Louis Pasteur e Robert Koch de que a partir do sangue de pacientes que apresentavam certas doenças era possível isolar seres microscópicos, denominados posteriormente de bactérias, que se começou a aceitar o fato de que estes componentes poderiam estar vinculados com o desenvolvimento de doenças. No final dos anos 1890, Friedrich Löffler e Paul Frosch descobriram os vírus, e essa teoria ficou cada vez mais evidente (5).

Devido à elevada letalidade da doença e a sua falta de controle, uma missão científica comissionada pelo exército americano e liderada pelo cientista médico do exército Walter Reed foi enviada a Cuba em 1900, com o objetivo de investigar melhor

a doença que dizimava a população local e descobrir suas causas e como eliminá-la (1,5). Um médico da equipe, Jesse Lazear, estudou os relatos de Finlay e se expôs deliberadamente, a fim de experimentação, a um mosquito que havia feito repasto sanguíneo em um paciente contaminado. Dias depois ele começou a desenvolver sintomas típicos de febre amarela e acabou sucumbindo à doença. Seus colegas então enviaram um relatório à Reed com a descrição do seu caso, e este decidiu continuar os experimentos de Lazear. Ele testou tanto a hipótese da transmissão pelos mosquitos quanto expôs indivíduos saudáveis a materiais contaminados com secreções de pacientes que padeciam de febre amarela grave. Neste último, todos permaneceram saudáveis, porém na tenda dos mosquitos muitos desenvolveram sintomas. Assim, Reed descreveu o mosquito *Aedes aegypti* fêmea como o agente transmissor da doença (5). A comunidade científica ainda lançava dúvidas quanto esta teoria, porém cientistas em outras partes do mundo conseguiram validar os experimentos de Reed, corroborando seus achados. Dessa forma, tornou-se possível tomar medidas assertivas para prevenir a doença, com o foco na eliminação do vetor. O simples uso de telas em quartos de hospital e a destruição dos focos de reprodução do mosquito já foram medidas essenciais para a diminuição da circulação de febre amarela em diversas localidades (5). Em 1947, a Organização Panamericana de Saúde iniciou um programa de eliminação do artrópode nas Américas, e em 1972 o vírus havia sido eliminado em mais da metade do território no qual circulava trinta anos antes (11). Tempos depois, descobriu-se que o vírus era também capaz de infectar outras espécies de mosquitos de florestas, tornando a erradicação da doença por meio de controle dos vetores impraticável (12).

Ainda assim, o agente etiológico continuava desconhecido. Foi apenas um quarto de século depois da identificação do vetor que os cientistas Stokes, Bauer e Hudson conseguiram isolar o vírus e demonstrar que macacos *Rhesus* eram suscetíveis à doença ao serem inoculados com o sangue de indivíduos infectados. Esse experimento possibilitou posteriormente o desenvolvimento da vacina atenuada, utilizada até os dias de hoje (1).

1.1.2 Epidemiologia

A febre amarela é uma doença infecciosa febril aguda sazonal, com maior ocorrência entre os meses de dezembro e maio, nos quais as temperaturas são mais elevadas e há alta prevalência de chuvas nas zonas tropicais e subtropicais do globo (13). A sua transmissão se dá pela picada de mosquitos fêmeas infectados com o YFV,

durante a realização do repasto sanguíneo, que nutre e colabora para a maturação de seus ovos. O vírus pode ser transmitido verticalmente da fêmea para sua prole, porém não há transmissão entre os hospedeiros, que podem ser seres humanos ou primatas não-humanos (PNH) (14).

O vírus da febre amarela pode ser transmitido por meio de ciclo silvestre, urbano ou ecótono (Figura 1). No ciclo silvestre, os principais vetores são mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, da família Culicidae. Estes se alimentam principalmente do sangue de PNH, dos gêneros *Alouatta* sp., *Callicebus* sp., *Callithrix* sp. e *Sapajusnas* sp., sendo o ser humano um hospedeiro acidental (15). No Brasil, as espécies *H. janthinomys* e *H. leucocelaenus* são as principais responsáveis pela transmissão, sendo que outras como *H. albomaculatus*, *S. glaucodaemon*, *S. chloropterus*, *S. cyaneus* e *S. soperi* contribuem na manutenção do vírus na natureza (14). Os mosquitos possuem grande poder de dispersão, podendo se deslocar pelo menos seis quilômetros de distância em poucos dias (15).

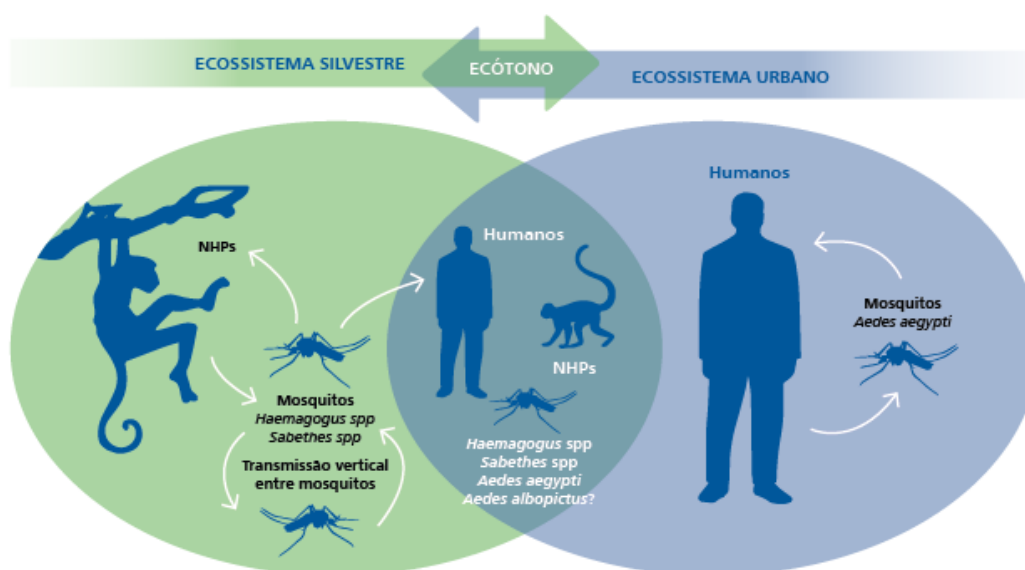


Figura 1. Representação esquemática dos ciclos de transmissão do vírus da febre amarela. O ciclo em primatas não-humanos é chamado de silvestre, enquanto a febre amarela urbana possui o ser humano como hospedeiro e o ciclo ecótono é a intersecção entre os dois (15).

No ciclo urbano, o *A. aegypti*, também pertencente à família Culicidae, é o principal vetor, também sendo permissivo aos vírus da dengue (DENV) e zika (ZIKV) (14). Já o ciclo ecótono de transmissão é a sobreposição dos ecossistemas silvestre e urbano. Com a perda progressiva de área florestal e a aproximação desenfreada da urbanização destes locais, os vetores do ciclo silvestre passaram a infectar também seres humanos,

e a presença de febre amarela em zonas urbanas pode favorecer o ressurgimento da transmissão urbana (14), que não é reportada no Brasil desde 1942, quando os últimos casos registrados ocorreram na cidade de Sena Madureira, no estado do Acre (16).

No país, essa doença constituiu um flagelo histórico, com grande prevalência entre metade do século XIX e meados do século XX. Ela só começou a diminuir, principalmente em relação aos casos urbanos, após campanhas de controle e a partir do desenvolvimento da vacina, na década de 1930. Ainda assim, até hoje a ampla distribuição dos vetores é um fator determinante na dificuldade da erradicação dos vírus transmitidos por eles (17).

Atualmente a área de circulação do vírus está restrita aos continentes sul-americano e africano (Figura 2), nos quais há maior presença de vetores e de PNH como hospedeiros. Em 2013, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou uma incidência de 84.000 a 170.000 casos de febre amarela apenas no continente africano, com 29.000 a 60.000 óbitos, sendo a maioria na África subsaariana (18). Em média, a doença atinge aproximadamente 200.000 pessoas por ano, causando 30.000 óbitos, e estima-se que 900 milhões de indivíduos estejam em risco todos os anos (19). Nos últimos anos, tem-se visto um aumento na ocorrência de epidemias e surtos, como em Angola e na República Democrática do Congo em 2015 e 2016, com 962 casos reportados (20).

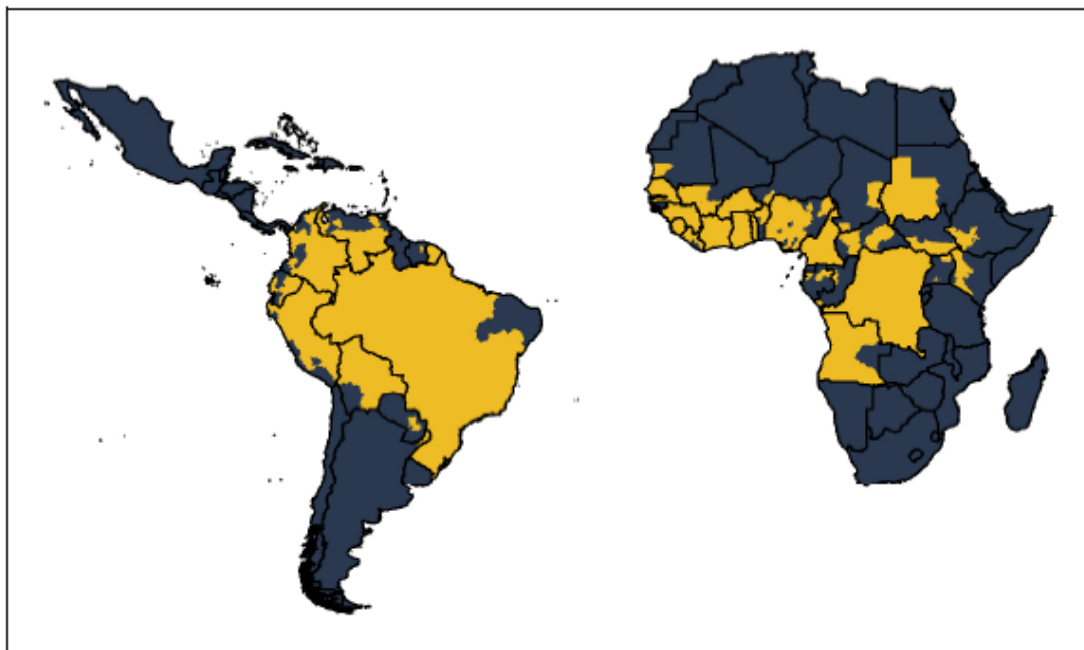


Figura 2. Áreas de circulação do YFV entre seres humanos no mundo. Em amarelo, locais nos quais casos de febre amarela têm sido reportados desde 1984 (20).

No Brasil, até a década de 1990, a doença era confinada à região amazônica e ao interior do país, com casos esporádicos na região Sudeste (21). Nos anos 2000, o número de casos no estado de São Paulo aumentou, sendo detectados casos autóctones, mortes e epizootias (21). Em 2014, a febre amarela reemergiu na região Centro-Oeste e avançou progressivamente pelo território brasileiro atingindo locais com baixa cobertura vacinal, onde a vacinação anti-amarela não era recomendada por não serem consideradas áreas tradicionais de risco para a doença (22). No estado de São Paulo, por exemplo, até 2015, apenas 25% da população vivia em áreas nas quais havia a recomendação vacinal (21).

Ainda assim, até 2016 os casos em humanos não ultrapassavam 200 por ano (23,24). Entre 2016 e 2018, contudo, ocorreram os maiores surtos da história da febre amarela silvestre já reportados desde que essa maneira de transmissão foi descrita nos anos 1930 (25) (Figura 3). Com a chegada do vírus nas regiões Sudeste e Sul do país, em uma população que não via o vírus circular naquela região havia décadas e que estava altamente suscetível, não tendo imunidade vacinal contra ele, foram registrados mais de 2.000 casos e 700 óbitos. A população alvo para a vacina foi então ampliada de 10 para 30 milhões, gerando uma crise no sistema de saúde e na distribuição de vacinas (21). Mesmo sendo um número não muito elevado de casos se comparado com anos anteriores no Brasil, o surto foi significativo devido ao histórico da região (13).

Somente no estado de São Paulo foram confirmados 648 casos autóctones e 230 óbitos entre 2016 e 2019, em mais de 80 cidades de várias regiões do estado. Dentre os casos confirmados, a maioria era de trabalhadores rurais do sexo masculino, um perfil comum entre os casos de febre amarela silvestre registrados no país. Neste mesmo período, os casos confirmados em primatas não-humanos chegaram a 843 (13,21). De 1º de janeiro até novembro de 2019 foram notificados 789 casos suspeitos, dos quais 67 casos autóctones foram confirmados. Destes, 13 evoluíram para o óbito, com taxa de letalidade de 19,4% (26).

O aumento de casos de febre amarela no Brasil nos últimos anos tem sido relacionado tanto às mudanças climáticas, como o aumento das temperaturas médias e das estações chuvosas, que favorece o deslocamento de mosquitos e a colocação e eclosão de ovos e larvas, quanto ao desmatamento de regiões florestais e a crescente urbanização que aumentam o contato do ser humano com animais silvestres. Esses fatores contribuem para que o ser humano fique mais exposto a vetores de patógenos que antes ficavam confinados às florestas (15), além de elevar o risco de reurbanização da doença pelo maior contato do vírus com os vetores do gênero *Aedes*. Por esta razão,

faz-se necessário que medidas de vigilância e prevenção tenham seu escopo de atuação ampliadas para uma população cada vez maior (15).

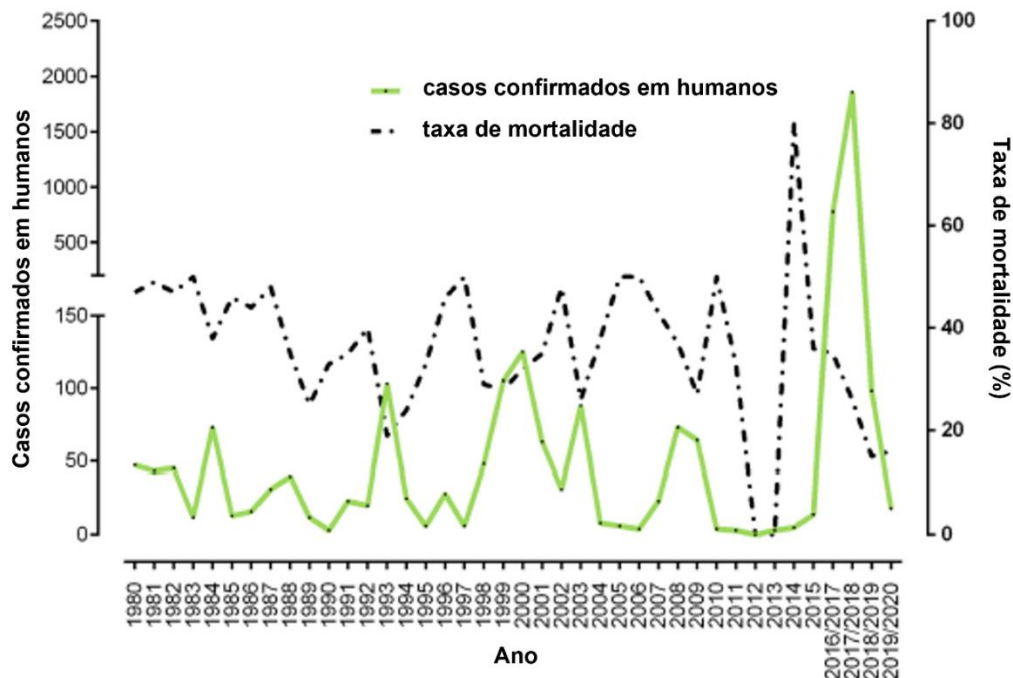


Figura 3. Série histórica do número de casos de febre amarela no Brasil. A linha contínua indica os casos confirmados em seres humanos no país, e a linha pontilhada indica a taxa de letalidade por ano, em relação ao total de casos, conforme reportado pelo Ministério da Saúde. Figura adaptada de Sacchetto e colaboradores (25).

Nesse contexto, uma informação importante para rastreamento do vírus da febre amarela e com capacidade de prever a sua propagação espacial e temporal é a vigilância de epizootias em PNH. A localização de macacos infectados com o YFV pode auxiliar na identificação de locais de maior risco e áreas de possível expansão do vetor, e essas informações podem auxiliar autoridades em saúde a determinar populações prioritárias para as quais campanhas de prevenção e vacinação devem ser intensificadas. Com o uso de modelos estatísticos, é possível prever com até dois meses de antecedência os locais prováveis de circulação do vírus, antes mesmo que ele seja identificado no local (21).

Como o YFV surgiu na África, as suas espécies de PNH foram selecionadas para resistir à doença, não apresentando sintomas na vigência da infecção pelo YFV. As espécies do continente americano, por outro lado, tiveram contato recente com o vírus e, portanto, são mais suscetíveis à infecção, desenvolvendo sinais clínicos e frequentemente evoluindo para óbito (27). A partir disso, em 1999 o Ministério da Saúde brasileiro propôs o acompanhamento das mortes de macacos como uma estratégia para

localizar áreas de transmissão do vírus (28). No Brasil, primatas do gênero *Alouatta* sp. são mais suscetíveis e morrem mais facilmente por conta da infecção; os gêneros *Sapajus* sp e *Callithrix* também mostram sinais de infecção, porém com menor mortalidade. Ambos podem ser encontrados na Amazônia e na Mata Atlântica, o que representa grande parte da porção territorial do país (28).

Com base nos dados de infecções de PNH e seres humanos, foi possível mapear o caminho do vírus da febre amarela no país (Figura 4), e determinar que o vírus que causou o surto recente na região Sudeste partiu da Amazônia em 2014, atingindo o centro do país através de corredores ecológicos. Pesquisadores brasileiros calcularam, com base em análises fitogeográficas do genoma do YFV em PNH (21), que até janeiro de 2018 o vírus moveu-se no sentido norte-sul a uma velocidade de 2,7 km/dia nos meses quentes e de 0,5 km/dia nos meses mais frios, auxiliando autoridades locais a agir rapidamente, antes da detecção de morte de muitos macacos, sinal este que sugere a alta circulação do vírus em determinada região (28).

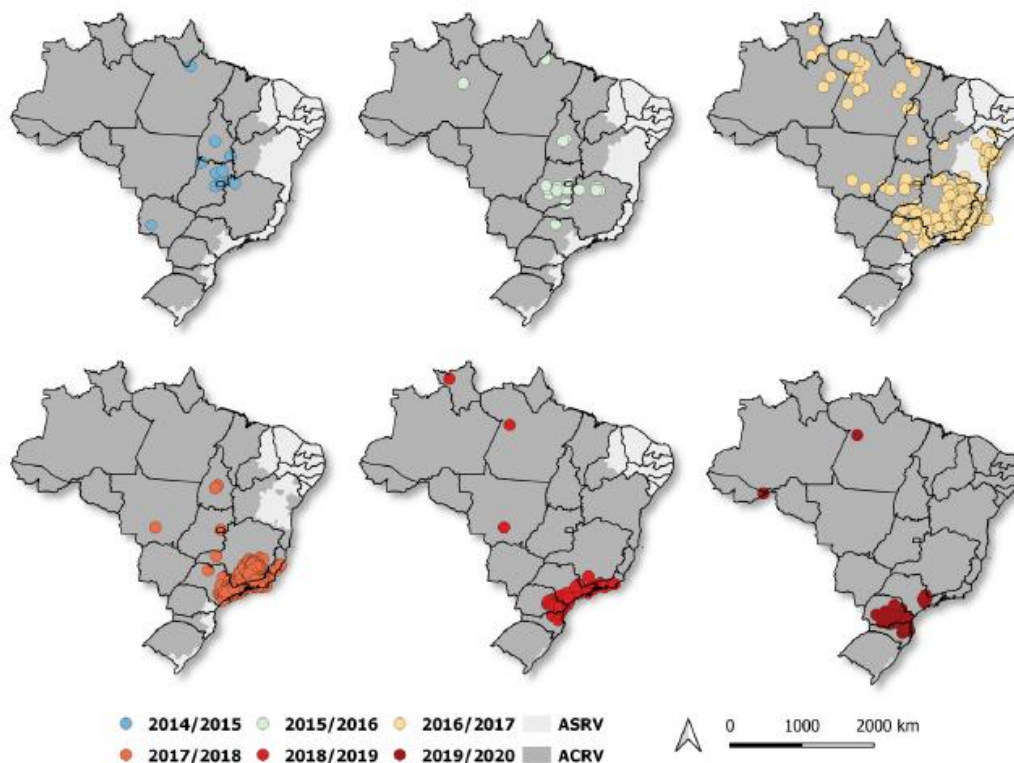


Figura 4. Municípios brasileiros com casos de febre amarela em seres humanos e/ou primatas não-humanos, de julho de 2014 a junho de 2020. ACRV: área com recomendação vacinal. ASRV: área sem recomendação vacinal (29).

1.1.3 Manifestações clínicas

A suscetibilidade à infecção pelo YFV é universal, e a maioria dos casos é assintomática. Nos indivíduos que desenvolvem sintomas após a incubação viral, que varia de três a seis dias (30), a maioria apresenta febre e cefaleia, que se resolvem espontaneamente. Entretanto, aproximadamente 30% destes podem desenvolver a forma clínica da doença, caracterizada por três fases, denominadas infecção, remissão e intoxicação (Figura 5). A fase de infecção é iniciada após a incubação do vírus, e o paciente pode apresentar subitamente sintomas inespecíficos como febre moderada, calafrios, mialgia, cefaleia e vômitos. Os sintomas duram até uma semana, e nesse período a carga viral começa a aumentar, sendo detectável a partir de 24 a 48 horas antes do aparecimento dos sintomas, e permanecendo detectável até duas semanas ou mais (31). Nessa fase o ser humano pode infectar mosquitos transmissores. Seus exames laboratoriais mostram leucopenia, neutropenia e pouca elevação das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (23,30).

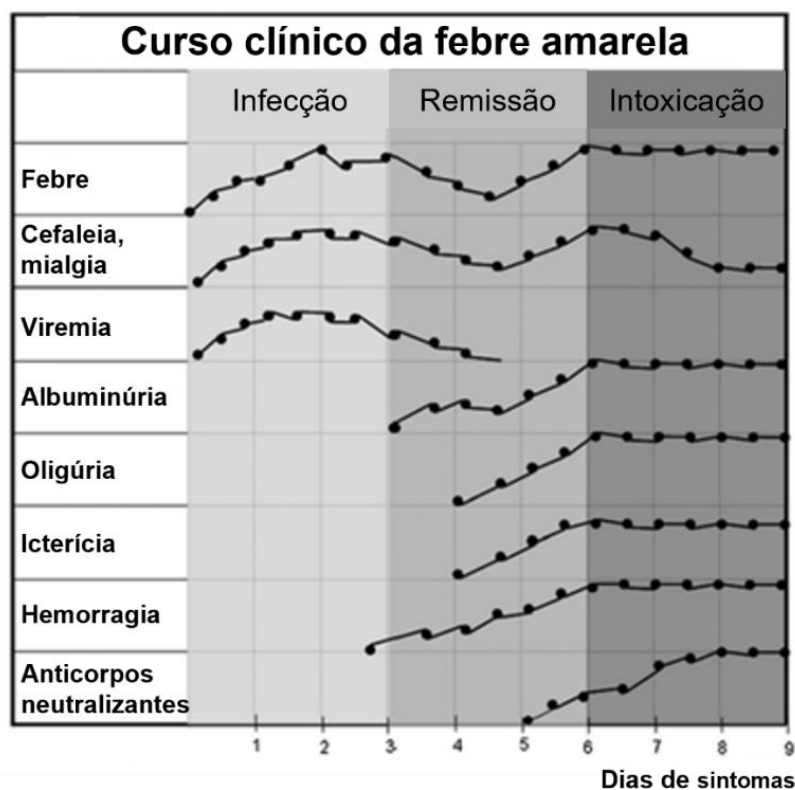


Figura 5. Estágios clínicos da febre amarela. A partir da infecção, a febre amarela pode evoluir para remissão ou intoxicação (gravidade). Adaptado de Quaresma e colaboradores (32).

A fase de remissão é caracterizada por uma melhora súbita dos sintomas que pode durar de um a dois dias, na qual a infecção pode ser abortiva – o paciente pode se recuperar – ou evoluir para gravidade. Neste último caso inicia-se a fase toxêmica, que tem início após três a seis dias do início dos sintomas, e se desenvolve em um a cada sete pacientes infectados com o YFV. Esse período é caracterizado por febre alta, astenia e vômitos frequentes com aspecto hemorrágico, além de insuficiência hepatorenal caracterizada por icterícia, oligúria, anúria e albuminúria. É acompanhado de manifestações hemorrágicas em mucosas e em locais de punção venosa, prostração intensa, comprometimento sensorial, torpor, coma e evolução para óbito. O pulso torna-se mais lento, apesar da temperatura elevada, situação conhecida como sinal de Faget. O indivíduo pode evoluir para o óbito entre sete e 14 dias, geralmente por insuficiência hepática fulminante, ou progredir para sepse bacteriana e fúngica, hemorragias e arritmias cardíacas, levando também ao óbito por conta de choque, hipotensão e acidose metabólica associadas (23,33,34). Nessa fase, não é comum a detecção de viremia, mas já é possível quantificar imunoglobulina (Ig) M circulante. A taxa de letalidade da febre amarela varia entre 20 e 50%, sendo que nas últimas epidemias esse valor foi de 39% (33–35).

Nos exames laboratoriais, pacientes graves possuem enzimas hepáticas aumentadas, em especial AST acima de 1200 UI/L (36), além de níveis elevados de creatinina e ureia no soro, albumina na urina, trombocitopenia, tempos de coagulação e protrombina elevados e redução de fatores de coagulação produzidos pelo fígado (33). Todos esses fatores podem indicar lesão nos hepatócitos, dano no tecido hepático, surgimento de icterícia, complicações renais e hemorragias, levando ao óbito (23).

1.1.4 Diagnóstico

As manifestações clínicas da febre amarela são muito semelhantes com aquelas causadas por outras infecções, tais como dengue, leptospirose, malária e hepatites virais. Com isso, a confirmação laboratorial é essencial para a correta identificação do patógeno e assim se aplicar a melhor conduta clínica (34). No caso da febre amarela, são utilizados ensaios sorológicos, que incluem captura de IgM por ensaio de imunoabsorção enzimática e testes de neutralização do soro por redução de placas, ou virológicos, como o uso de biologia molecular para detecção do genoma ou antígenos virais ou o isolamento de vírus a partir de amostras de sangue e tecidos (37). A escolha do teste depende em grande parte da quantidade de dias que se passaram desde o início dos sintomas (Figura 6).

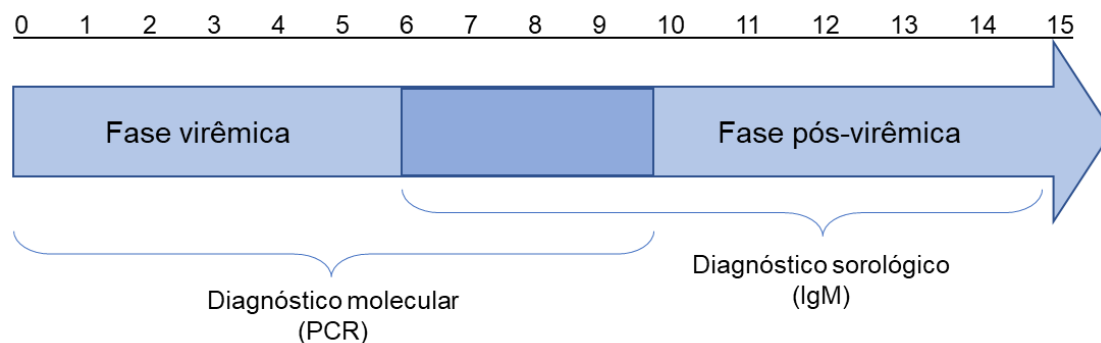


Figura 6. Janelas para diagnóstico de febre amarela, de acordo com o tempo decorrido após o início dos sintomas. A faixa azul-escura simboliza a intersecção entre a detecção molecular e sorológica. Adaptado de PAHO, 2018 (37).

Nos ensaios sorológicos, a detecção de IgM anti-YFV até sete dias após o início dos sintomas, na ausência de vacinação recente e de detecção de outros orthoflavivírus, sugere positividade para infecção pelo YFV. Ainda assim, em áreas nas quais há conhecida circulação de DENV e ZIKV, é difícil descartar reatividade cruzada nestes testes diagnósticos, devido à semelhança estrutural entre esses vírus. Também é importante ressaltar que até o momento há poucos ensaios comerciais validados para o diagnóstico de febre amarela; os imunoenaios geralmente usados são feitos *in house* (37). Os ensaios de redução de placas são os melhores para a detecção de anticorpos específicos, porém necessitam de cultura celular e controles padronizados, restringindo a possibilidade de realização desse teste a laboratórios com estrutura apropriada. Além disso, os resultados demoram dias para serem gerados, o que pode atrasar o diagnóstico do paciente, não apresentando a prontidão necessária em caso de surto da doença (34). De toda maneira, cada resultado laboratorial encontrado deve ser relacionado com a clínica do paciente, à área de moradia e/ou trabalho, ao histórico de viagens, à presença de outros orthoflavivírus circulantes e ao histórico de vacinação, para se chegar em um diagnóstico mais preciso (37).

Os métodos de biologia molecular são considerados mais confiáveis para a detecção viral, por meio da identificação do genoma viral diretamente em amostras de soro ou plasma, nos 10 primeiros dias da infecção (37). Nessa técnica os iniciadores (ou *primers*) utilizados para a amplificação do YFV são específicos da espécie, fazendo com que seja possível a diferenciação entre orthoflavivírus, e até mesmo entre cepas selvagens e vacinais (34). Por meio da detecção de RNA viral também é possível identificar o YFV no sangue e outros tecidos provenientes de casos fatais em até 20 dias após o início dos sintomas. No sêmen e na urina, o YFV pode se manter detectável

por períodos maiores do que no soro, tendo sido identificado, respectivamente, até 20 ou 25 dias após o início dos sintomas (34).

A utilização de diagnóstico por imuno-histoquímica em amostras de fígado também é utilizada para detectar o vírus em casos fatais após a autópsia, sendo importante na investigação de epizootias e confirmação do diagnóstico de indivíduos que morreram por conta da doença, porém sem constatação laboratorial, para fins de notificação e rastreio (34,37). Em casos suspeitos, as amostras devem ser coletadas independentemente da data de início dos sintomas (37).

Por fim, mesmo sendo um vírus identificado há quase 100 anos e conhecido da comunidade científica, há relativamente poucos testes no mercado, e sua especificidade é limitada para uso em locais nos quais outros orthoflavivírus circulam simultaneamente (34).

1.1.5 Tratamento

Apesar de ser uma doença conhecida há séculos, não há, até o momento tratamentos específicos para a febre amarela. Há diversos relatos antigos com descrições de terapias naturais, como o uso de plantas nativas da América do Sul e até uso de compostos de mercúrio, panaceias utilizadas desde o século XVIII com o intuito de mitigar os sintomas, mas sem impacto direto na doença (38,39). Hoje em dia, o tratamento continua sendo baseado no manejo de sintomas, tanto nas manifestações mais leves, quanto em casos de hospitalização, nos quais é importante o repouso do paciente, reposição de líquidos e sangue e se necessário acompanhamento em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (14).

A pesquisa de antivirais para tratar a febre amarela tem sido debatida, pois uma molécula ideal deveria ter amplo espectro, para atuar contra outros orthoflavivírus, e ser barata, de modo que possa ser empregada em países com desvantagem socioeconômica, que são as regiões mais acometidas pela doença (40). Atualmente, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram a eficácia do antiviral sofosbuvir contra a febre amarela (41), medicamento este que tem sido avaliado em um estudo clínico em andamento no Hospital das Clínicas em São Paulo com pacientes com doença aguda (42). A plasmaferese também foi uma abordagem utilizada como tentativa de diminuir a carga viral e repor fatores de coagulação, porém sem resultados publicados até o momento (43).

A eficácia e segurança que o uso de abordagens baseadas em anticorpos monoclonais para tratamento específico da febre amarela também está atualmente sob

investigação (44); porém, é sabido que este tipo de intervenção em orthoflavivirose pode ser complexa devido ao risco de ocorrência de aumento de resposta induzida por anticorpos (ADE, do inglês *antibody-dependent enhancement*). Esse fenômeno pode ocorrer quando os anticorpos contra um vírus possuem reatividade cruzada de baixa afinidade para proteínas de outros orthoflavivirus, ou mesmo possuem capacidade subneutralizante. Isso tem sido observado em casos de infecção secundária por diferentes sorotipos de DENV (45) e sua ocorrência tem sido exploradas em diversas outras orthoflavivirose (46).

Há também investigação do uso de imunomoduladores, que em modelos animais mostraram diminuir a viremia; contudo, a sua utilização deve ser feita em casos que estão no início da infecção, o que pode ser difícil de identificar em áreas com endemias de outros orthoflavivírus. Ainda assim, no caso de pacientes mais graves, com detecção de tempestade de citocinas, o uso de corticosteroides mostrou-se eficaz na redução da mortalidade (33).

Para além do tratamento e manejo dos sintomas, as medidas de prevenção são muito importantes no controle da dispersão da febre amarela no país. Deve-se limitar o acesso de mosquitos transmissores a pessoas suscetíveis, principalmente aos doentes, com uso de telas de proteção e repelentes. Em áreas de transmissão conhecida, é importante monitorar o ambiente e eliminar focos de *A. aegypti*, a fim de evitar a reurbanização da doença. Não obstante, o mais importante e o que mais fez a diferença no combate da febre amarela em várias regiões do mundo é a vacinação (14).

1.1.6 Vacinação

A vacinação contra a febre amarela é a medida mais eficaz para o controle e prevenção da doença (14), e é um dos grandes sucessos entre as vacinas virais (47). Seu uso desde a década de 1930 contribuiu para a erradicação da febre amarela em algumas regiões do mundo e para diminuição global do número de casos (48).

O YFV foi isolado pela primeira vez em 1927, do sangue de um homem ganês infectado, chamado Asibi. O seu nome foi emprestado à cepa, e ela hoje em dia é a cepa referência da febre amarela. A partir de então, nos anos seguintes, foi possível o desenvolvimento de uma vacina com o vírus atenuado que reduziu o impacto da doença na população, além do medo associado a ela (49).

Para diminuir a sua infectividade e possibilitar o uso em uma formulação vacinal, o vírus foi cultivado sucessivamente em tecidos de embriões de camundongo e galinha e testado em macacos, para verificar a ausência de neurovirulência e viscerotropismo,

ou seja, a capacidade do vírus de gerar viremia, sintomas neurológicos e infecção hepática (48). Após cerca de 220 passagens, a cepa foi comprovadamente atenuada e em 1936 a primeira vacina foi desenvolvida por Max Theiler, Wray Lloyd e Hugh Smith, rendendo a Theiler o Prêmio Nobel de Medicina em 1951 (48). Atualmente, duas subcepas diferentes são utilizadas nas composições vacinais, a 17D-204 e a 17DD, derivadas de passagens posteriores da cepa gerada por Theiler e colaboradores. Elas possuem apenas 48 nucleotídeos de diferença em relação à cepa selvagem, codificando 20 aminoácidos, mas o suficiente para não gerarem a doença selvagem (50). A cepa 17DD é utilizada na América do Sul, enquanto a 17D-204 é utilizada nas demais localidades do mundo (48).

A vacina antiamarílica foi introduzida no Brasil logo em 1937 e, neste mesmo ano, campanhas de vacinação foram organizadas no país e em outros locais da América do Sul, bem como no continente africano em situações emergenciais. Na África, foi somente em 1988 que a OMS recomendou a introdução da vacina no programa de imunização (48). Desde então, a vacinação contra febre amarela foi realizada em mais de 500 milhões de pessoas, sendo um sucesso para a saúde pública (51).

A vacina 17DD, produzida e utilizada no Brasil, é um imunobiológico seguro e altamente eficaz na proteção contra a doença, com imunogenicidade de 90% a 98%. Ela é capaz de induzir uma resposta de anticorpos protetora que pode ser detectada entre o sétimo e décimo dia após a aplicação da vacina, razão pela qual recomenda-se que ela seja aplicada ao menos dez dias antes da exposição a uma área endêmica para YFV (14). A população alvo para a vacinação é composta por indivíduos entre 9 meses e 59 anos de idade. Desde 2017 apenas uma dose da vacina é recomendada pelo Ministério da Saúde, para pessoas a partir dos 5 anos de idade (23). Para crianças entre nove meses e cinco anos recomenda-se administrar uma dose aos nove meses e uma dose de reforço aos quatro anos (52,53).

Até recentemente, uma dose de reforço era recomendada a cada 10 anos, porém a partir de 2013 a OMS decretou que a proteção gerada pela vacina era duradoura e uma dose única seria suficiente para gerar proteção ao longo da vida (54). Ao longo dos anos, diversos grupos de pesquisa comprovaram a longa duração da resposta protetora contra o vírus (55–58) e a mínima diferença que o reforço causava na resposta imune, uma vez que os anticorpos neutralizantes ainda estão presentes 10 anos após a vacinação, podendo se manter em níveis relevantes entre 30 e 40 anos (23,59).

Durante alguns meses de 2018, devido ao rápido aumento do número de casos de febre amarela e a escassez de vacinas para todos, alguns estados da região Sudeste do Brasil aplicaram-na em doses fracionadas, correspondentes a um quinto da dose

total, a fim de suprir a grande demanda por vacinação e prevenir um rápido aumento do número de casos durante o surto no país (60). Essa ação baseou-se nas experiências positivas durante o surto que ocorreu em Angola e na República Democrática do Congo em 2016 (61), e foi endossada pela OMS para situações emergenciais futuras (62). Casey e colaboradores mostraram que a dose fracionada foi eficiente em gerar soroconversão em 98% dos indivíduos vacinados, com níveis elevados de anticorpos um ano após a vacinação (61). Além disso, a imunogenicidade das doses fracionadas não foi inferior à da dose inteira (63); sendo assim, os indivíduos que receberam a dose fracionada não necessitam de uma dose de reforço posterior, uma vez que a resposta protetora foi detectada 10 anos após a imunização (64). No Brasil, o Ministério da Saúde atesta que indivíduos que receberam dose fracionada da vacina contra a febre amarela podem ser considerados adequadamente imunizados (14). Também devido aos surtos recentes, a vacinação anteriormente era recomendada apenas para viajantes que se deslocassem para áreas geográficas específicas do país, porém atualmente a recomendação abrange todo o território nacional (65).

A vacina é reconhecidamente segura, mas ainda pode induzir alguns efeitos adversos leves em 25% da população, como cefaleia, mialgia, febre baixa e desconforto no local da injeção. Reações mais graves são raras, mas já foram relatados na literatura casos de anafilaxia, doença neurológica ou doença viscerotrópica associada à vacinação (YEL-AVD, do inglês *YF vaccine-associated viscerotropic disease*). A anafilaxia pode ocorrer por conta de reações alérgicas a componentes da vacina ou a antígenos do ovo, dependendo do histórico do indivíduo. As síndromes neurológica (encefalites, encefalomielites) e viscerotrópica (o que pode levar a falha de múltiplos órgãos) podem ser difíceis de se distinguir de outras doenças como meningites ou hemorragias virais, e o número de ocorrências é extremamente baixo, com aproximadamente 1,6 casos por 100.000 doses de vacina, ocorrendo especialmente em idosos e pacientes imunocomprometidos (51,65–67).

A YEL-AVD foi descrita pela primeira vez em 1996, e pode estar relacionada com o surgimento de mutações na cepa vacinal 17DD, que podem aumentar a sua virulência (68). Nesse caso, o vírus vacinal possui a habilidade de infectar e causar danos a órgãos como fígado, baço, coração e rins (30), gerando sintomas semelhantes ao quadro de infecção pelo vírus da febre amarela selvagem (68). Em áreas endêmicas, o diagnóstico é realizado pela identificação do YFV 17D ou 17DD por meio de biologia molecular (37). Há dois padrões de risco para o seu desenvolvimento; um deles é de mulheres jovens com defeitos na imunidade inata, grupo no qual a letalidade pode ser alta, e o outro é

em homens idosos, com imunossenescência relacionada à idade, com letalidade mais baixa (69).

Ainda assim, a vacina é considerada segura para toda a população alvo (70). Em gestantes o risco não está totalmente calculado, porém sabe-se que o YFV não causa malformações fetais como o ZIKV, mas que pode ser transmitido ao recém-nascido via aleitamento materno (70). Com isso, as contraindicações da vacina são crianças com menos de seis meses de vida, pessoas que vivem com HIV com contagem de linfócitos CD4⁺ inferior a 200/mm³, pacientes em tratamento com medicamentos modificadores da resposta imune, pacientes transplantados, com imunodeficiências, neoplasias malignas ou com histórico de doenças do timo, e indivíduos com histórico de reações anafiláticas relacionadas a substâncias presentes na vacina, como ovo de galinha e seus derivados (14).

A vacina brasileira é cultivada em ovos de galinha embrionados e contém no mínimo 1000 LD50 (dose letal, do inglês *lethal dose*) do vírus atenuado da cepa 17DD do vírus da febre amarela (71). Esse valor corresponde a aproximadamente 27.000 unidades internacionais (UI). Como a OMS recomenda um mínimo de 5.000 unidades formadoras de placa por dose, a vacina brasileira contém aproximadamente cinco vezes a mais do que o mínimo recomendado, o que faz ser possível o fracionamento das doses sem prejuízo à eficácia e proteção (72). Sendo um vírus atenuado, ela induz baixa viremia, que decai entre quatro e sete dias após a dose única. Durante esse período é possível detectar IgM no plasma do indivíduo, porém não é possível diferenciar a resposta de IgM induzida pela vacina ou pela infecção natural. A detecção de IgM é possível de ser feita até duas semanas após a vacinação, e a partir de 10 dias, quando já é possível a detecção de IgG circulante, o indivíduo pode se considerar protegido da infecção (37). Em indivíduos vacinados a menos de 30 dias e que desenvolvem sintomas característicos de infecção pelo YFV, são necessários testes capazes de diferenciar as cepas selvagem da vacinal (68).

Investigar o título de anticorpos neutralizantes é o padrão ouro para definir o correlato de proteção vacinal (73,74). Antigamente, esse valor era calculado a partir da imunização passiva de macacos e subsequente desafio com o vírus selvagem. Então, calculava-se o título de anticorpos por meio do índice de neutralização em log (LNI, do inglês *log neutralization index*) a partir de uma concentração constante de soro e quantidades crescentes de vírus. Um LNI $\geq 0,7$ é usualmente reconhecido como protetor. Contudo, essa metodologia é complexa, necessita de amostras pré- e pós-vacinação e não reflete o contexto de infecção natural ou imunização em massa. Então, o teste de neutralização por redução de placas substituiu o ensaio em macacos e, a

partir de então, considera-se neutralização de 50 a 80-90% como indicativo de proteção. Ambos os ensaios são longos, requerem infraestrutura específica, treinamento dos operadores e são de difícil padronização, fazendo com que não sejam práticos na rotina clínica. Por isso, há a necessidade de novos ensaios que sejam mais práticos e representem melhor o nível de proteção da população vacinada (70,73).

Ainda assim, sabe-se que quase 100% dos indivíduos entre um e 60 anos que recebem uma dose da vacina soroconvertem após 10 dias da vacinação (73). Essa taxa vai diminuindo com o tempo, podendo chegar a 80% na população adulta após 10 anos, e varia de acordo com a endemicidade da área e a circulação de outros orthoflavivírus, além das características individuais como idade, nutrição, infecções concomitantes, microbioma e outras (73).

1.2 Vírus da febre amarela

1.2.1 Visão geral

O vírus da febre amarela (*Orthoflavivirus flavi*) pertence à família Flaviviridae e ao gênero *Orthoflavivirus*, anteriormente conhecido como *Flavivirus*. Ele é considerado o vírus que deu origem a esse gênero, que foi nomeado “vírus amarelo” em latim por conta da aparência amarelada dos indivíduos acometidos pelo YFV, que infecta o fígado e gera grave quadro de hepatite (74). Hoje, o gênero abrange mais de 70 espécies diferentes, mas que apresentam semelhanças importantes na morfologia do vírion, na organização do genoma e na estratégia de replicação (17). A maioria é transmitida por artrópodes e mais de 40 são responsáveis por doenças em animais e seres humanos na maioria dos continentes (17,75). Além da febre amarela, outros orthoflavivírus de grande importância para a saúde pública são o ZIKV, DENV, o vírus da encefalite japonesa e o vírus do Nilo ocidental, os quais podem causar uma miríade de doenças que incluem quadros como encefalites e febres hemorrágicas (17).

O YFV tem estrutura esférica com aproximadamente 50 nm de diâmetro. Contém um capsídeo icosaédrico que abriga uma fita de RNA simples, de polaridade positiva, de aproximadamente 11.000 bases que codificam uma região não traduzida (UTR, do inglês *untranslated region*) na extremidade 5', uma matriz de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frame*) longa e uma outra UTR na extremidade 3'. A ORF codifica uma grande poliproteína que após clivagem por proteínas virais e do hospedeiro geram três proteínas estruturais amino-terminais – capsídeo (C), envelope (E) e pré-membrana (prM) – e sete proteínas não-estruturais carboxi-terminais (NS, do inglês *non-structural*

protein) – NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, enumeradas de acordo com a ordem de síntese (Figura 7) (76).

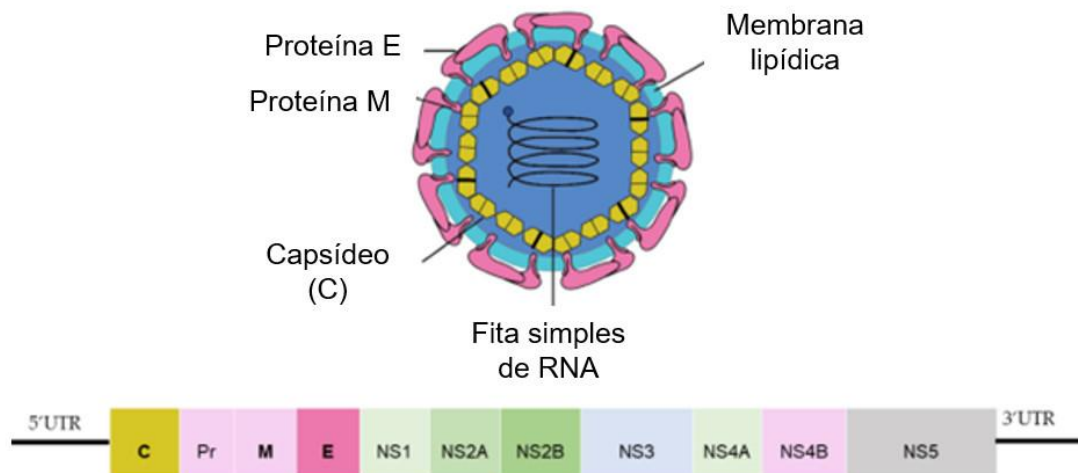


Figura 7. Estrutura geral dos orthoflavivírus. O vírion (acima) expressa os genes das proteínas estruturais e não estruturais (abaixo). Adaptado de Mourosi e colaboradores (77).

De maneira geral, os vírus entram nas células do hospedeiro por meio de endocitose mediada por receptor, ainda não caracterizado, com mudança de conformação da proteína E (78). A partícula viral se funde com a membrana do endossomo, em um processo dependente de pH ácido, para liberar o seu genoma no citoplasma. A replicação ocorre no próprio citoplasma, e o genoma viral é traduzido em uma poliproteína maior, que por meio de processamento co- e pós-traducional dá origem às proteínas estruturais e não-estruturais. A montagem do vírus é realizada no retículo endoplasmático, no qual a proteína C envolve o RNA viral recém-sintetizado para protegê-lo e mantê-lo em uma conformação simétrica, e este forma o core viral, juntamente com uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro. Nesta camada a proteína E é expressa, e a proteína prM protege o envelope de mudanças conformacionais irreversíveis enquanto o vírion é secretado por meio de compartimentos acidificados. A proteína prM, por sua vez, é quebrada em um peptídeo pr solúvel e a proteína de membrana M permanece associada aos vírus. A partícula madura, então, sai da célula hospedeira por exocitose (77,79). As proteínas não-estruturais têm papel na replicação viral, empacotamento do genoma e escape do sistema imune do hospedeiro, sendo que a NS1 auxilia no processo de replicação, a NS3 possui atividade de helicase e protease e a NS5 age como polimerase e

metiltransferase (77). O processo de replicação viral dos orthoflavivírus está esquematizado na Figura 8.

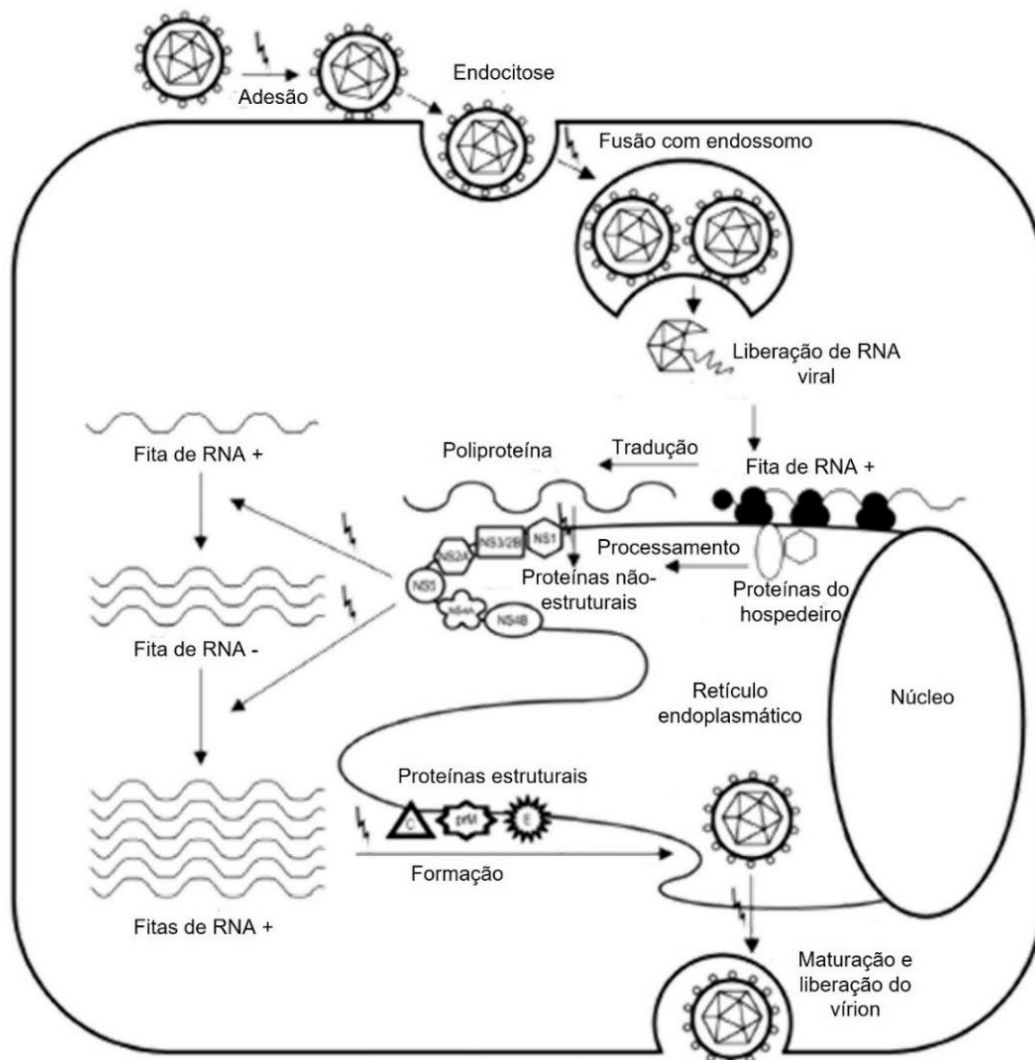


Figura 8. Representação esquemática da estratégia de replicação de um orthoflavivírus. O vírus entra na célula por meio de endocitose e o RNA viral é liberado após fusão com endossomo. Ele então é traduzido por ribossomos do hospedeiro em uma única poliproteína que será processada pelo hospedeiro e por proteases virais. O RNA viral e proteínas estruturais são montados em vírions, que saem da célula por exocitose e se aproveitam da bicamada lipídica do hospedeiro para expressar a proteína do envelope. Adaptado de Julander (40).

1.2.2 Análise molecular

O primeiro sequenciamento completo do YFV foi publicado por Rice e colaboradores em 1985 (80). Atualmente, as cepas de YFV selvagens circulantes constituem um único sorotipo e há sete genótipos descritos (30), cinco que circulam na

África, nomeados *West Africa I*, *West Africa II*, *East Africa*, *East/Central Africa* e *Angola* e dois na América do Sul, *South America I* e *South America II*, derivados dos genótipos africanos (25,34).

As taxas de evolução descritas para YFV são semelhantes entre os genótipos e menores do que de outros orthoflavivírus como o DENV. A variação genética estimada entre clados é de 10-23% entre os genótipos africanos e de apenas 5% entre os sul-americanos. Entre os dois continentes, há uma disparidade de 16% na sequência genética (34). Na América no Sul, ambos os genótipos circulantes se diversificaram em diversas linhagens que persistem em áreas diversas como Brasil, Bolívia, Peru, Venezuela e Caribe (25).

Durante o surto de 2017-2019, os vírus identificados foram classificados como sendo do genótipo *South America I*, com três clados diferentes (81,82). Essa linhagem provavelmente se disseminou independentemente da Venezuela para a Amazônia brasileira em 2005 e foi responsável pela epidemia no sudeste brasileiro de 2008 a 2009, com oito mutações de possível importância funcional sendo investigadas (15,83). Em 2017, foi identificada uma cepa circulante que possuía substituições de aminoácidos em porções conservadas do vírus, o que poderia impactar na capacidade de infecção viral (15).

Nessa época, a circulação do vírus selvagem estava mais intensa em locais nos quais havia campanhas de vacinação em andamento, fazendo com que houvesse casos nos quais as pessoas poderiam entrar em contato com os dois vírus ao mesmo tempo (36). Como os vírus são homólogos, ou seja, pertencem ao mesmo sorotipo, eles possuem processo de infecção e replicação semelhantes. Uma vez que ambos estejam no mesmo organismo, eles podem infectar a mesma célula, podendo ocorrer assim um fenômeno conhecido como interferência viral, o que significa que, em determinadas condições, a infecção por um vírus pode gerar imunidade temporária a outro vírus (84), ou a própria célula infectada não permite a multiplicação de um segundo vírus, seja ele homólogo ou heterólogo (85). Esse mecanismo já foi reportado em macacos infectados com as cepas neurotrópica e pantrópica (ao mesmo tempo viscerotrópica e neurotrópica) da febre amarela; quando inoculados com uma das duas cepas, quase todos os macacos morreram, mas quando inoculados com as cepas pantrópica e neurotrópica, com um intervalo variando de 10 minutos a 4 horas da primeira infecção com a cepa pantrópica, apenas dois morreram (86). A recombinação, por outro lado, ocorre quando os dois vírus infectam a mesma célula do hospedeiro, em quantidade suficiente, e podem trocar porções do seu genoma. Essas trocas podem ser homólogas ou não-homólogas, e dependendo do resultado isso pode influenciar a evolução do

vírus. O fenômeno de recombinação, no geral, pode ser associado com a expansão de hospedeiros, geração de novos vírus e aumento na virulência e patogênese, além de modificar o tropismo tecidual, evasão do sistema imune e resistência a antivirais (87). Isso já foi visto com o DENV (88) e o vírus Influenza (89), e testes já foram feitos com YFV *in vitro*, em situações desenhadas para favorecer a ocorrência de recombinação (90). Nesse estudo, células foram primeiramente infectadas com a cepa selvagem YFV Asibi e depois inoculadas com altas concentrações de uma variação da cepa YFV 17D (90). Porém, é importante ressaltar que ambos os fenômenos ainda não foram descritos em seres humanos em relação à febre amarela.

1.3 Resposta imune do hospedeiro

1.3.1 Visão geral

Dados da literatura têm demonstrado que o YFV, seja ele selvagem (transmitido pelo mosquito vetor) ou vacinal (proveniente da vacina de vírus atenuado), pode induzir uma resposta semelhante no hospedeiro, dado o seu grau de semelhança. Após a sua inoculação, as células dendríticas (DCs) são as primeiras a reconhecê-lo. A proteína E se liga em um receptor ainda não caracterizado, que faz com que as partículas virais entrem nas células via endossomos (32), e estas ativam as DCs por meio dos receptores do tipo Toll (TLR) 2, 7, 8 e 9. Também por meio dos TLR, o YFV ativa células *natural-killer* (NK), aumentando a expressão de seus receptores e sua capacidade citolítica. Enquanto isso monócitos e macrófagos são ativados da mesma forma, e produzem fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumour necrosis factor*) e interleucina (IL) 10 em resposta à infecção. Ainda que sejam semelhantes, como o vírus vacinal é atenuado, ele possui algumas diferenças estruturais em relação ao vírus selvagem. A sua proteína E possui 12 aminoácidos diferentes em relação à cepa ancestral Asibi, e com isso Quaresma e colaboradores (32) verificaram que o vírus vacinal 17D infecta as células hospedeiras mais eficientemente, o que leva a uma maior entrada de RNA viral no citosol e, conseqüentemente, a maior ativação das cascatas de citocinas, como também a uma ativação mais rápida de linfócitos T e maior produção de anticorpos. As células infectadas com 17D produziram níveis muito mais elevados de interferon (IFN) α , IFN- β , IL-29, CCL5 e CXCL10, característicos da resposta antiviral. Ainda assim, no citoplasma, ambos os vírus estimulam o receptor TLR-3, que se liga em RNAs de dupla fita e desencadeia cascata de sinalização que culmina com a produção de várias

citocinas, em especial IFN do tipo I, cuja função é gerar um estado antiviral na célula (91,92).

Uma vez infectando células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen presenting cells*), como DCs e macrófagos, o vírus é transportado até os linfonodos mais próximos, onde permanecerão se replicando (33). Durante esse processo, os tecidos linfoides passam por mudanças morfológicas, com o aparecimento de grandes células mononucleares, distensão dos folículos e necrose de centros germinativos de células B (33). Neste momento o indivíduo torna-se um reservatório temporário, podendo infectar mosquitos vetores que por sua vez irão transmitir o vírus para outros seres humanos, mantendo-o, assim, em circulação (23).

Nos linfonodos, as APCs apresentam antígenos virais para linfócitos T e B e sua ativação compõe a resposta imune adaptativa. A maior parte das informações disponíveis a respeito da imunidade celular existe por conta de estudos com a cepa vacinal, dada a abundância de indivíduos vacinados e a dificuldade de se obter grandes coortes de indivíduos infectados, especialmente no início da infecção. Nesses trabalhos, foi demonstrado que ambas as populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ recrutadas possuem resposta polifuncional. Quanto aos linfócitos T CD4⁺, a vacinação induz um perfil misto Th1/Th2, com produção de IL-2, IFN- γ , TNF, IL-12, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Há também a presença de uma subpopulação de células T, as chamadas T foliculares auxiliares, que expressam CXCR5 e participam na formação de centros germinativos, contribuindo na produção de anticorpos com alta especificidade pelos linfócitos B. Na infecção natural, a quantidade de células T CD4⁺ é diretamente proporcional à carga viral do indivíduo. Os linfócitos T CD8⁺ também produzem citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF, além de granzima B, com função citotóxica. Após a primeira exposição, à vacina ou ao vírus selvagem, há geração de populações de células de memória central e efetora específicas, derivadas tanto das populações celulares T CD4⁺ como de T CD8⁺, que decaem com o tempo mas permanecem detectáveis após 25 anos da vacinação (93,94).

As citocinas produzidas pelas células infectadas e pelos linfócitos possuem papel importante na patogênese da doença, pois já foi demonstrada maior concentração de citocinas pró-inflamatórias em quadros fatais de febre amarela (95). Ademais, em casos fatais, foram identificadas as citocinas pró- e anti-inflamatórias IFN- γ , TNF, IL-6, IL-8, fator de crescimento transformador (TGF, do inglês *transforming growth factor*) β , proteína quimioatraente de monócitos 1, IL-10 e antagonista do receptor de IL-1, formando um quadro semelhante ao da sepse bacteriana (33). No estágio terminal da doença também é possível observar leucocitose granulocítica, provavelmente por conta

da quantidade elevada de IL-8 e TNF no soro. Essas citocinas ativam granulócitos, que por sua vez liberam fator de ativação de plaquetas, elastase e outras proteases, além de leucotrienos, o que pode modificar a integridade endotelial, causando extravasamento capilar (33,34).

Durante a progressão da replicação viral, o YFV pode migrar e se replicar no fígado, que é o principal órgão acometido pela doença (33). Entre 10 e 15 dias após a infecção é possível verificar alteração nos hepatócitos, com degeneração eosinofílica e apoptose (30). O infiltrado celular é mínimo, e é caracterizado por células NK, DCs, linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e CD45RO⁺ ativados, nas regiões medial e periportal. Nestes locais, as citocinas predominantes são TNF, IFN- γ e TGF- β (33), sendo que TNF e IFN- γ são diretamente responsáveis por induzir apoptose em hepatócitos ao se ligar em seus receptores, desencadeando a morte celular (32).

Carvalho e colaboradores (96) também encontraram citocinas de perfil Th17 presentes no fígado de pacientes que morreram por conta da infecção pelo YFV. Eles verificaram tanto a presença de IL-6 e IL-23, citocinas responsáveis por estimular a diferenciação e proliferação de linfócitos Th17, quanto IL-17A, citocina produzida por eles e responsável pelo recrutamento de leucócitos, em especial neutrófilos, e indução de inflamação. Outros órgãos como baço, linfonodos, rins e coração também podem ser acometidos pela infecção pelo YFV, a partir de lesão viral direta e apoptose (30).

Outro braço da resposta imune muito estudada contra os orthoflavivírus, e aquela que é um dos componentes essenciais para o controle da disseminação da infecção, é a imunidade humoral (46). Nos linfonodos, além dos linfócitos T, também há presença de linfócitos B maduros naíves que expressam IgM e IgD na superfície como seus receptores. Quando os antígenos são apresentados diretamente para as células B, elas são ativadas e migram para a zona folicular onde os linfócitos T se encontram. Na região dos folículos, células B recebem sinais co-estimulatórios de linfócitos T CD4⁺ e proliferam em grande quantidade. Durante a proliferação, as células B passam por um processo de maturação de afinidade e se diferenciam em células plasmáticas produtoras de IgG específica e neutralizante, de longa e curta duração, ou em células B de memória, com menor especificidade, que podem sobreviver por anos no indivíduo (97,98).

Estudos antigos mostram que o soro de indivíduos que sobreviveram após infecção pelo YFV era capaz de proteger macacos e camundongos de desafio com o vírus selvagem, fazendo com que anticorpos neutralizantes ainda sejam aceitos como o principal correlato de proteção contra a doença (99,100). Entre quatro e sete dias após o início da infecção é possível detectar IgM, e entre 10 e 14 dias as concentrações de

IgG começam a aumentar. Conforme observado no contexto da vacinação, a concentração de IgM é maior do que a de IgG no primeiro mês após a administração da vacina, permanecendo detectável por um tempo, e diminuindo gradativamente, ainda que possa ser detectada em baixas concentrações por meses e até anos após a infecção (54). Os anticorpos IgG aparecem na segunda semana de infecção e entre 7 a 10 dias após a vacinação, e podem persistir por 35 anos ou mais (54).

Em ambos os casos de infecção ou de vacinação, há geração de memória, tanto humoral quanto celular, durável ao longo da vida do indivíduo. Até o momento não há relatos de pacientes que contraíram o vírus e desenvolveram a doença mais de uma vez, e uma dose da vacina também é suficiente para proteger o indivíduo ao longo dos anos (48). A Figura 9 apresenta um resumo dos correlatos de proteção contra a febre amarela, e a Figura 10 mostra um resumo da cinética de ativação das respostas imunes inata e adaptativa.

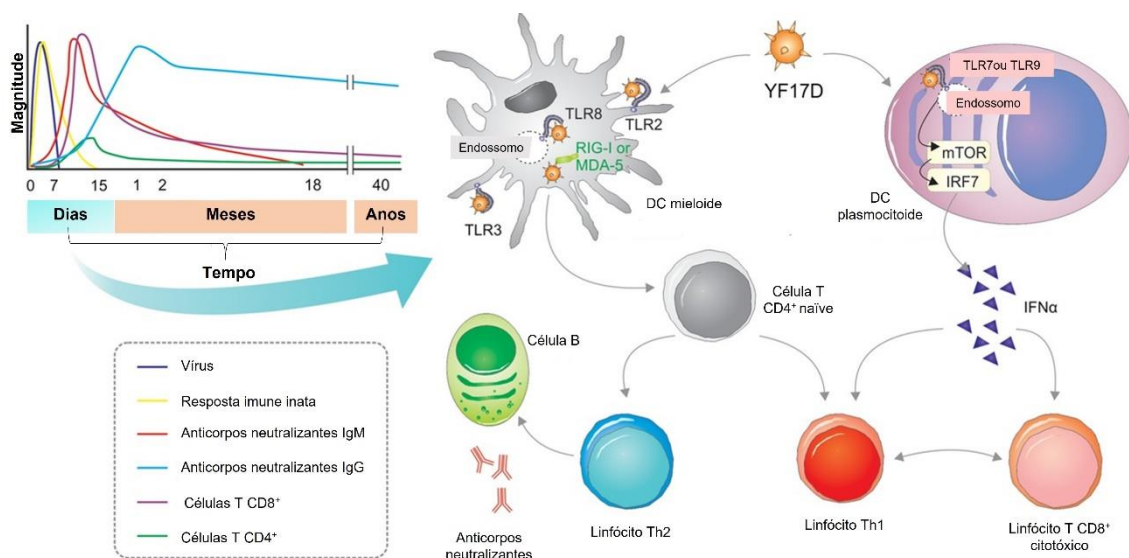


Figura 9. Correlatos de proteção contra vacina 17D da febre amarela. TLR: Receptor do tipo Toll. DC: célula dendrítica. Th: célula T auxiliadora. Adaptado de Pulendran e colaboradores (101).

Tipo de resposta imune		Dias									Mês	Ano	
		1	2	3	4-6	7	8-13	14-16	17-30				
Imunidade inata	NK	IFN- γ ⁺					++						
		IL-4 ⁺					↓		↓	↓			
		CD56 ⁺					+++	+	+				
		CD69 ⁺	+	+	+	+	+++	+	+				
		CD56 ⁺	+	+	+	+	+++	+	+				
	Monócitos	TNF ⁺					+		+	+			
		IL-10 ⁺							+	+			
	pDC	T CD8 ⁺					+	+	+++	+	18		
		IFN- γ ⁺					+	+	+++	+			5
	Imunidade adaptativa	T CD4 ⁺	IL-2 ⁺	+	+	+	+	+	+++	+			
TNF ⁺			+	+	+	+	+++	+	+				
Acs Neut		IFN- γ ⁺	+	+	+	+	+	+++	+				
		IL-4 ⁺	+	+	+	+	+	+++	+				
Viremia	IgM					+	+	+++	+		4		
	IgG					+	+	+	+		Até 35		

Figura 10. Cinética da resposta imune a partir da vacinação com vacina de vírus atenuado contra a febre amarela. + detectado; ++ aumentado; ↓ diminuído; +++ pico de detecção; NK: células natural-killer; pDC: células dendríticas plasmocitoides; Acs Neut: anticorpos neutralizantes. Tabela adaptada de Liang, Lee e Jin (102).

1.3.2 Anticorpos neutralizantes e proteína E

Tanto a infecção quanto a vacinação geram anticorpos neutralizantes contra o YFV, que possuem como característica a habilidade de se ligar aos vírus de maneira a bloquear a infecção (103). Eles são reconhecidos desde o final dos anos 1890, quando foi visto que a transferência passiva de anticorpos ou soro de indivíduos imunes era importante para a conferência de proteção imediata à infecção (104). Até o momento, os anticorpos neutralizantes são o principal correlato de proteção contra a infecção natural e conferem proteção duradoura (102).

O principal alvo dos anticorpos neutralizantes é a proteína do envelope viral (Figura 11). A proteína E é uma glicoproteína estrutural que se apresenta na porção exterior da superfície do vírus, e é responsável pela ligação aos fatores de adesão do hospedeiro e receptores celulares, o que levará à internalização do vírus e ao início da infecção. Ela se apresenta como dímero e possui três domínios (DI, DII e DIII) que codificam a superfície do envelope viral (77). Os domínios I e II são responsáveis por iniciar a infecção, e o DIII possui o sítio de ligação que interage com a membrana do hospedeiro (77), tendo dessa forma epítopos críticos para a neutralização viral (75,105). A proteína E contém um sítio de glicosilação que é importante para a infectividade e o tropismo viral, pois ele participa da adesão ao receptor (77).

Outras proteínas virais também podem ser alvo dos anticorpos, como a NS1 que, ainda que não seja extracelular, é secretada e induz a geração de anticorpos específicos (106). De maneira geral, a proteção induzida pela vacinação contra a febre amarela ou os anticorpos gerados após infecção natural contam com os seguintes mecanismos: bloqueiam diretamente o receptor de ligação, inibem a fusão viral, auxiliam a eliminação viral de maneira dependente do receptor Fc, ativam a lise mediada pelo sistema complemento tanto do vírus quanto da célula infectada, e mediam a citotoxicidade dependente de anticorpos. Todos esses mecanismos ajudam a explicar a elevada eficácia da vacina antiamarílica (102).

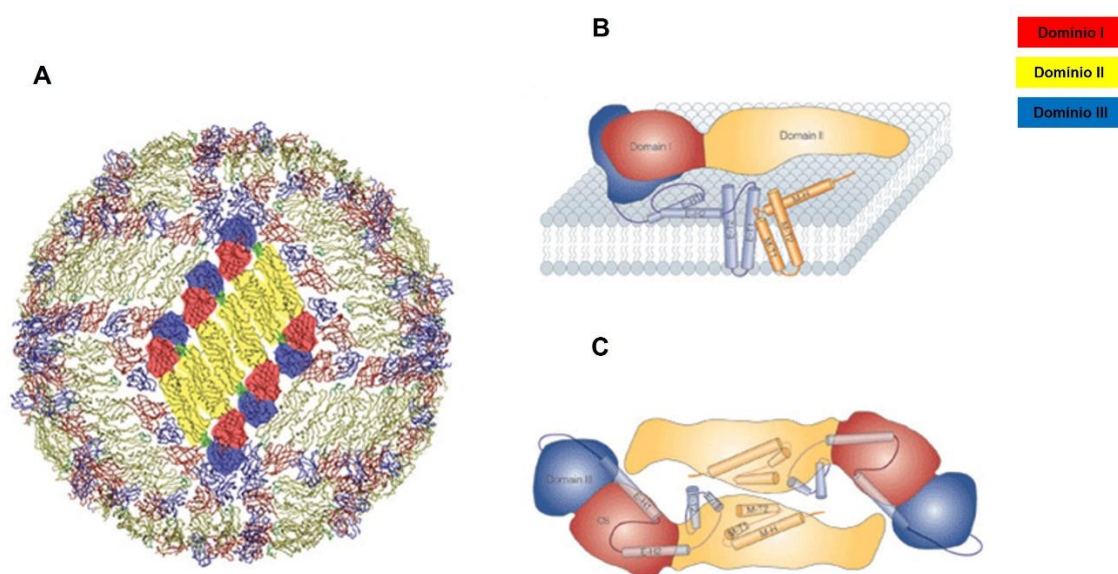


Figura 11. Estrutura da proteína do envelope (E) dos orthoflavivírus. (A) Em um modelo de vírus da dengue, destaque para uma parte da membrana viral, contendo 3 dímeros paralelos. Os domínios estão coloridos de acordo com a legenda. (B) Visão lateral da proteína E, com destaque aos domínios transmembrana. (C) Visão superior do dímero da proteína. Adaptado de Mukhopadhyay, Kuhn e Rossmann (110).

No caso de contato com a cepa selvagem ou vacinal, as células B conduzem a resposta humoral através da produção de anticorpos específicos. Após encontro com o antígeno, as células passam por diferenciação em células plasmáticas de vida curta e produzem majoritariamente IgM, para a resposta inicial mais rápida. Já nos centros germinativos, as células T foliculares auxiliaadoras selecionam células B de alta afinidade que passam pelo processo de mudança de isotipode Ig e maturação de afinidade (107), levando à produção de diferentes tipos de imunoglobulinas (103). Essas células são então diferenciadas em plasmoblastos, células plasmáticas ou células B de memória. Plasmoblastos são as células efectoras produzidas mais rapidamente e de vida mais

curta, que surgem no início da resposta de anticorpos, enquanto as células plasmáticas são células de vida mais longa; já as células B de memória possuem variações em alguns marcadores de superfície, mas também são células antígeno-específicas persistentes (108,109).

As células B são ativadas e começam a se proliferar sete dias após a imunização, e o ápice de frequência dessas células ocorre em 14 dias, com os valores retornando ao basal logo após (107). Os plasmoblastos, menos de 1% da população total de células B no estado basal, seguem a mesma cinética, retornando a valores basais em 28 dias (107). Apenas a minoria destas células será responsável pela produção de anticorpos neutralizantes com alta especificidade (103). O fim da viremia coincide com o aparecimento dos anticorpos neutralizantes, que estão presentes em 80% da população vacinada no décimo dia após a vacinação e em 98-99% após 30 dias (30). Na Figura 12, pode-se ver a cinética dos anticorpos neutralizantes em relação aos sintomas clínicos da doença e em relação à carga viral.

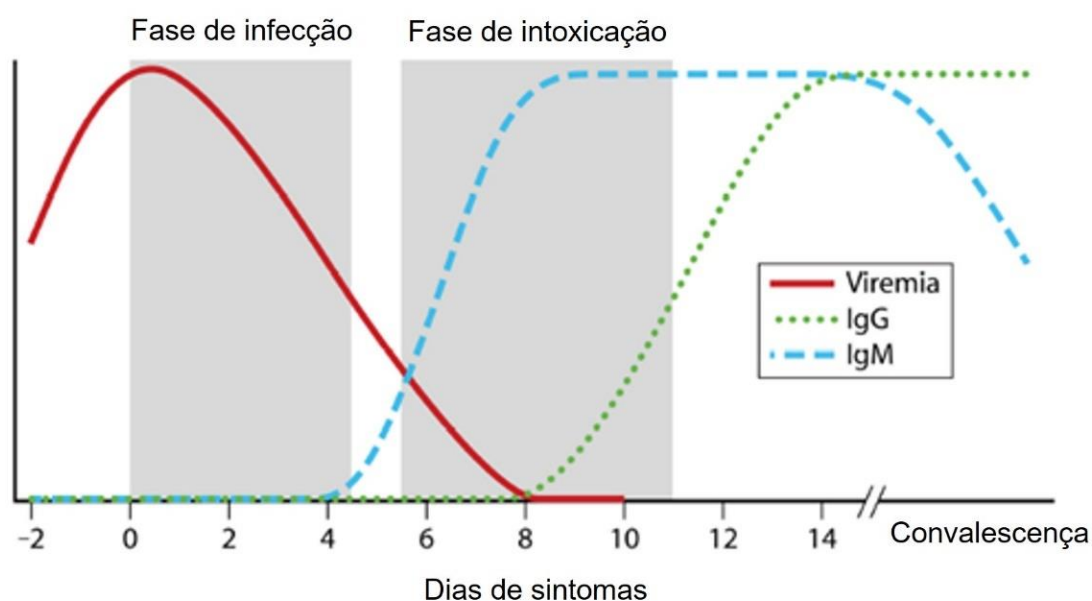


Figura 12. Cinética da carga viral e resposta humoral na infecção pelo vírus da febre amarela selvagem. O pico da carga viral ocorre durante a fase de infecção, e aproximadamente 12% dos pacientes evoluem para a fase de intoxicação, durante a qual os títulos de anticorpos do tipo IgM e IgG começam a aumentar. Adaptado de Waggoner e colaboradores (111).

Como os anticorpos são parte essencial da resposta imune do hospedeiro e a maioria deles é direcionada para a proteína E, mutações que ocorrerem na sua sequência podem impactar diretamente o potencial de neutralização dos anticorpos e, por consequência, a carga viral do paciente, em caso de infecção, ou no menor título de

anticorpos gerados, em caso de vacinação (112). Com isso, é importante mapear as cepas circulantes e buscar polimorfismos, para se detectar antecipadamente um possível escape da resposta imune.

1.4 Justificativa

O surto de febre amarela que ocorreu na região sudeste do Brasil entre 2016 e 2019 possibilitou o estudo e a geração de dados valiosos sobre marcadores da evolução clínica e predição de mortalidade destes pacientes, resultando em publicações inéditas na área de atenção ao paciente com febre amarela grave (31,36,113–115). Como o surto ocorreu em áreas nas quais a cobertura vacinal era baixa, os governos estaduais ampliaram as campanhas de vacinação, o que levou milhares de pessoas a buscarem o imunizante em um curto espaço de tempo (116). Uma vez que o vírus selvagem já estava em circulação durante as imunizações em massa, houve casos nos quais indivíduos que já haviam sido infectados, com ou sem sintomas, receberam a vacina, como foi constatado em alguns estados brasileiros (113,114,117), inclusive em São Paulo (115). Na época, como o objetivo dos artigos era descrever parâmetros clínicos da doença e avaliar o seu desfecho, os aspectos imunológicos desta condição de vacinação recente ainda não foram avaliados.

Originalmente, as vacinas foram desenvolvidas com o objetivo de prevenir a infecção por um patógeno, e nesse caso o ideal é que sejam administradas antes da provável exposição. Contudo, em alguns casos elas também podem contribuir para a diminuição dos sintomas ou gravidade da doença mesmo após a exposição ao patógeno. Sabe-se que a vacina tríplice viral, contra os vírus do sarampo, caxumba e rubéola, se administrada até 72 horas após a exposição ao vírus do sarampo pode prevenir o desenvolvimento da doença ou gerar um quadro mais leve, ou mesmo impedir a transmissão do vírus para outros indivíduos, criando assim um bloqueio vacinal (118,119). Há também a recomendação da vacinação de indivíduos contra a hepatite B após a sua exposição ao vírus, com o objetivo de prevenir infecção crônica ou doença hepática (120).

No caso da febre amarela esse esquema vacinal após a infecção ainda não foi reportado na literatura, somente casos nos quais indivíduos receberam o imunizante muito tempo antes da exposição e desenvolveram a doença tempos depois, mas com sintomas mais leves (117). No surto recente do país, por conta da alta circulação do vírus na população durante as campanhas de vacinação, a infecção e a imunização ocorreram quase simultaneamente, fazendo com que não houvesse tempo hábil para a

produção de anticorpos neutralizantes e resposta celular específica para a prevenção da infecção e manifestação dos sintomas. Mesmo assim, a vacinação pode ter impactos na evolução e desfecho clínicos da doença, contexto ainda carente de estudos.

Sendo assim, faz-se necessário avaliar o uso da vacinação recente em indivíduos infectados com o YFV selvagem e que desenvolveram a doença, para verificar se há algum provável benefício clínico ao paciente. Ainda, como a vacina é composta por vírus atenuados, é importante avaliar se há interação com o vírus selvagem tanto a nível genômico quanto a nível da geração de resposta imune, uma vez que as cepas possuem diferenças genéticas e estruturais que podem alterar a resposta humoral do hospedeiro (112). Esses conhecimentos gerados poderão servir de base para o melhor entendimento da interação da vacina com a infecção natural, bem como do desenvolvimento da febre amarela, doença que ainda permanece pouco estudada em pacientes por ela acometidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a resposta imune humoral de indivíduos imunizados com a formulação atenuada YFV 17DD em vigência de infecção natural pelo vírus selvagem da febre amarela.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar nos prontuários de pacientes internados entre 2018 e 2019 com diagnóstico confirmado para febre amarela, a presença de vacinação com a vacina YFV 17DD;
- Quantificar a presença de anticorpos IgM e IgG totais no plasma de pacientes com e sem vacinação, ao longo do tempo;
- Pesquisar e comparar a presença de anticorpos anti-YFV neutralizantes nos mesmos grupos, contra as cepas vacinal e selvagem;
- Avaliar a carga viral dos grupos e isolar e sequenciar vírus provenientes de indivíduos vacinados e infectados;
- Comparar as sequências virais encontradas com cepas vacinais e com vírus selvagens circulantes à época dos casos;
- Relacionar os títulos de anticorpos encontrados com dados clínicos do paciente, juntamente com a evolução e o desfecho da doença, para buscar padrões de resposta ou indicadores que possibilitem responder se a vacinação tem impacto na geração de resposta imune humoral nos pacientes, bem como no desfecho da doença.

3. MÉTODOS

3.1 Aprovação ética para a realização da pesquisa

A autorização para uso das amostras biológicas aqui citadas, com a finalidade de pesquisa, foi obtida por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos voluntários e/ou responsáveis. O estudo obteve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (CAAE 47380321.7.0000.0068), cujo parecer encontra-se no Anexo A.

3.2 Coortes e amostras biológicas

3.2.1 Voluntários infectados

As amostras de pacientes com infecção pelo YFV foram provenientes de indivíduos que procuraram atendimento e foram acompanhados pelo Instituto de Infectologia Emílio Ribas e pelo Hospital das Clínicas da FMUSP. As amostras foram coletadas entre janeiro de 2018 e abril de 2019 como parte integrante do projeto "Arboviroses no contexto da imunotivação crônica pelo vírus da imunodeficiência humana" (CAPPesq: 15477, CAAE: 59542216.3.1001.0068). A caracterização da coorte coletada no ano de 2018 foi previamente publicada por Kallás e colaboradores (36) e Ho e colaboradores (115).

Todos os pacientes tinham idade igual ou superior a 18 anos e, após o aceite do TCLE, foram incluídos os indivíduos que possuíam histórico de moradia ou viagem a áreas geográficas com casos confirmados de febre amarela. A infecção pelo YFV foi confirmada pela detecção do RNA viral no sangue e, nos casos que foram a óbito, em tecidos coletados no momento da autópsia, por meio de reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR, do inglês *quantitative polymerase chain reaction*). Os pacientes admitidos no estudo não viviam com HIV e não apresentavam coinfeções no momento da admissão. Eles foram acompanhados do momento da entrada no hospital até 60 dias após a inclusão no estudo ou até o óbito. Amostras de sangue foram coletadas periodicamente, em intervalos descritos na Tabela 1. O dia do início dos sintomas foi reportado pelo próprio paciente. Os pacientes que cumpriram os critérios de inclusão e que concomitantemente participaram de estudo clínico com

medicamentos antivirais, foram excluídos da coorte, para retirar o viés do medicamento nas análises que seguiram. A Figura 13 apresenta o esquema de coletas das amostras biológicas e os pontos no tempo nos quais os ensaios foram realizados.

Tabela 1. Padronização do intervalo de coleta de amostras biológicas conforme o número de dias após início dos sintomas.

Código	Intervalo adotado	Dias após início dos sintomas
D2	(-1d)	1-2
D4	(±1d)	3-5
D6	(+2d)	6-8
D10	(-1d)	9-10
D12	(-1d)	11-12
D14	(-1d +5D)	13-19
D30-80	-	30+

D/d: dias de sintomas.

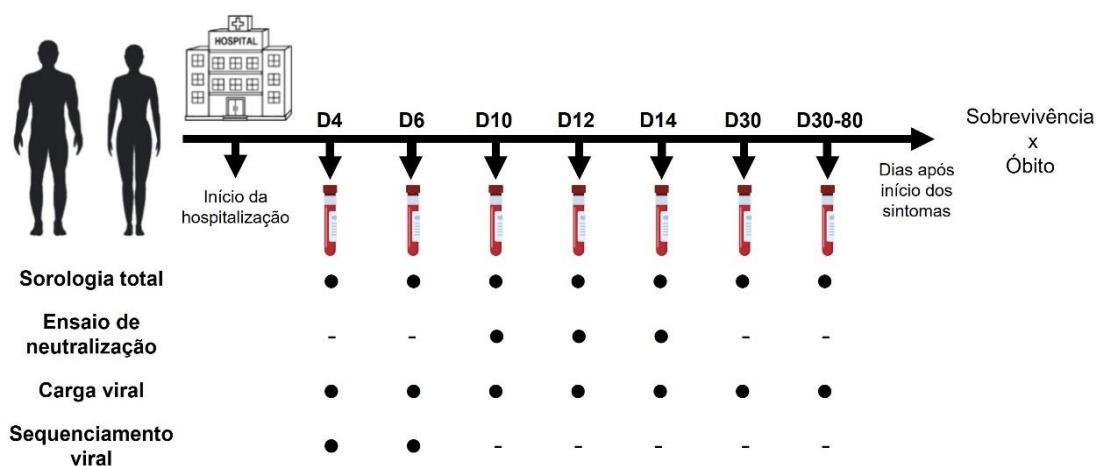


Figura 13. Esquema de coleta de amostras de pacientes com infecção pelo vírus da febre amarela e os testes realizados em cada ponto de coleta. Os pacientes que deram entrada no hospital com sintomas e histórico consistente com a infecção e que aceitaram participar do estudo tiveram amostras de sangue coletadas entre 2 e 80 dias após o início dos sintomas (D). Os círculos em preto mostram os ensaios realizados, e os traços identificam as visitas nas quais os ensaios não foram realizados.

Dentre os pacientes com infecção pelo YFV confirmada, foi verificado o prontuário hospitalar para a busca de informação referente à vacinação com YFV 17DD. Caso não fosse encontrado no prontuário, o dado era obtido por meio de entrevista com o paciente ou familiares. Com essa informação, os pacientes foram divididos entre um grupo infectado e um grupo infectado vacinado, e para cada ensaio realizado foi utilizado

número de amostras diferentes, de acordo com a disponibilidade, descritos e discutidos em cada respectivo resultado.

3.2.2 Voluntários sem infecção (grupo controle)

Como grupo controle, foi utilizada uma coorte de indivíduos sem infecção pelo YFV e sem outras comorbidades conhecidas, coletada entre 2011 e 2014 como controles para o projeto "Avaliação da segurança e imunogenicidade de diferentes doses da vacina contra Febre Amarela 17DD em populações especiais" (CAPPesq: 0206/10, CAAE: 83631318.000.068), elaborado por Avelino-Silva (121). Os voluntários não possuíam histórico de infecção prévia por YFV ou vacinação contra febre amarela. No momento da inclusão (D0), foi coletado sangue total para coleta de células mononucleares do sangue periférico (CMSP), plasma e soro e após a coleta o voluntário recebeu uma dose da vacina YFV 17DD (Biomaguinhos). Os voluntários foram acompanhados periodicamente e após 28 dias da vacinação (D28) houve nova coleta de sangue. Para este estudo, foram utilizadas amostras de cinco voluntários nos pontos de coleta D0, D14 e D28, de acordo com a disponibilidade das amostras no biorrepositório do laboratório e com o pareamento com os grupos de pacientes infectados.

3.2.3 Coleta e processamento das amostras

Na admissão dos pacientes e voluntários nos estudos, foi coletado sangue periférico em tubos Vacutainer® contendo ACD (ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose, BD Biosciences, EUA) ou EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, BD Biosciences, EUA), e as amostras foram processadas no Laboratório de Investigações Médicas 60 da FMUSP. O plasma foi separado da porção celular do sangue total após duas centrifugações. Na primeira, os tubos foram centrifugados diretamente a 652 RCF por 10 minutos, e o plasma coletado em tubos de 15 mL. Depois, estes tubos foram novamente centrifugados a 1578 RCF por 10 minutos, para a separação de resíduos celulares, e o sobrenadante foi aliquoteado em criotubos de 1 mL e armazenado em freezer a -80°C para uso posterior.

3.3 Quantificação de anticorpos totais circulantes

Os anticorpos IgM e IgG totais foram quantificados por meio de ensaio de ELISA em amostras de plasma. Foram utilizados os kits *Human IgM ELISA Kit* (número de catálogo BMS2098) e *Human IgG Total ELISA Kit* (número de catálogo BMS2091), da Invitrogen (Thermo Fischer Scientific, EUA). Ambos os protocolos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de plasma foram previamente incubadas a 56°C por 30 min em banho-maria, para inativação do sistema complemento. Para o kit de IgM, as amostras foram utilizadas em uma diluição final de 1:20.000 e para o kit de IgG as amostras foram diluídas 250.000 vezes. Para minimizar variações do ensaio, a curva padrão foi acrescentada em todas as placas. A curva padrão e as amostras foram analisadas em duplicata, e foram aceitos valores de duplicata que estivessem em uma faixa de 20% da média entre os dois valores. As absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 450 nm, com comprimento de referência de 620 nm, no equipamento Biotek Gen5 (Agilent, EUA), e os dados foram capturados por meio do programa da mesma empresa.

Na Tabela 2 estão discriminadas as concentrações das curvas-padrão de cada kit. Para o cálculo da concentração de anticorpos em cada amostra, foi calculado um modelo de regressão não-linear de 4 parâmetros para a análise de IgG e 5 parâmetros para a análise de IgM com as médias de absorbância e as médias de concentração de todos os pontos da curva. Os valores de absorbância das amostras foram avaliados e as concentrações puderam ser interpoladas. Para obtenção dos valores finais, as concentrações foram multiplicadas pelo fator de diluição correspondente.

Tabela 2. Faixa de concentração da curva padrão dos anticorpos IgM e IgG, de acordo com o fabricante.

Padrão	Concentração de IgM humana (ng/mL)	Concentração de IgG humana (µg/mL)
1	1000,0	0,100
2	500,0	0,050
3	250,0	0,025
4	125,0	0,013
5	62,5	0,006
6	31,3	0,003
7	15,6	0,002
Branco	0,0	0,000

3.4 Ensaios *in vitro*

3.4.1 Células

Para a preparação dos estoques virais e ensaios *in vitro* com vírus e/ou amostras de pacientes foram utilizadas células Vero (*Cercopithecus aethiops*, CCIAL 057/ATCC® CCL-81™) e células C6/36 (*Aedes albopictus*, ATCC® CRL-1660™), ambas adquiridas no Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz. As células Vero foram cultivadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, e as células C6/36 foram cultivadas em estufa a 28°C sem insuflamento de CO₂, de acordo com o recomendado pelo comerciante.

3.4.2 Meios de cultura e reagentes

O meio de cultura utilizado para crescimento e manutenção das células Vero foi o meio 199 1X (Gibco, EUA) suplementado com 10% de glutamina 200 mM (Gibco, EUA) e penicilina/estreptomicina (Gibco, EUA) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA), para cada 500 mL de meio, referenciado a partir de agora como M199-10. Para os ensaios *in vitro* e amplificação de vírus foi utilizado o mesmo meio, porém com suplementação de 5% de soro fetal bovino, sendo aqui referido como M199-5.

Para as células C6/36 foi utilizado o meio L-15 de Leibovitz (Gibco, EUA) suplementado com 10% de glutamina (Gibco, EUA) e penicilina/estreptomicina (Gibco, EUA), 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA) e 0,3% de caldo de triptose (Merck, Alemanha), para cada 500 mL de meio.

Para repique e/ou passagem das células aderentes e para os ensaios foi utilizado tampão fosfato-salino (PBS, LGC Biotecnologia, Brasil), diluído uma vez (1X) em água destilada autoclavada; esta solução foi utilizada para a lavagem e retirada do excesso de meio das células. Para dissociação da monocamada de células Vero da garrafa de cultura foi utilizada solução de tripsina 0,2% com Versene a 0,02% (Instituto Adolfo Lutz, Brasil). As células C6/36 foram soltas com pipetagem vigorosa ou raspadores específicos para cultura celular.

3.4.3 Controle de qualidade das culturas celulares

A cada dois dias as células eram analisadas em microscópio invertido e a turbidez do meio de cultura foi checada para busca de possível contaminação bacteriana ou

fúngica. Mensalmente, o DNA de alíquotas dos sobrenadantes das garrafas de cultura era extraído para análise, via qPCR, de contaminação por bactérias do gênero *Mycoplasma* sp., com os kits PrepSEQ™ de extração de ácido nucleicos e MycoSEQ™ Mycoplasma Real-Time PCR Detection Kit (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, EUA), segundo recomendações do fabricante.

3.4.4 Cepas virais

Os vírus utilizados foram as cepas YFV 17DD, isolada a partir da vacina atenuada, e YFV ES-504 (KY885000.2), isolada em 2017 a partir de amostra de sangue de primata não-humano *Alouatta clamitans*, com infecção positiva para YFV. Ambas as cepas foram isoladas e gentilmente doadas pela Dra. Myrna C. Bonaldo (Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ).

3.4.5 Preparo dos estoques virais

Quando as cepas virais foram recebidas, o YFV 17DD foi cultivado em células Vero para amplificação e geração de estoque, e o YFV ES-504 foi inicialmente expandido em células C6/36, de acordo com a adaptação às respectivas espécies celulares. Posteriormente, o YFV ES-504 também foi amplificado em células Vero para aumento da titulação viral e verificação de compatibilidade à linhagem celular que seria utilizada nos ensaios.

No dia anterior à infecção, as células foram repicadas e semeadas em garrafas de 75 cm² com tratamento para adesão celular (Biofil, China) e deixadas em cultura até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Para cada vírus foi preparada uma garrafa controle e uma garrafa para infecção. No dia da infecção, foi inoculado 1 mL de vírus estoque na garrafa de infecção e 1 mL de M199-5 (para células Vero) ou de L-15 (para células C6/36) na garrafa controle; as culturas foram incubadas em estufa adequada por uma hora, com homogeneização em gangorra das garrafas de 15 em 15 minutos. Após a incubação, acrescentou-se 19 mL de meio correspondente em cada garrafa e elas foram novamente incubadas, em condições adequadas, de um a sete dias, a depender da cepa viral.

A avaliação do crescimento viral foi realizada a partir da observação de presença e quantidade de citotoxicidade na monocamada celular. Diariamente, as garrafas inoculadas com os vírus foram observadas em microscópio invertido e comparadas com o aspecto da monocamada nas garrafas controle. Quando começaram a apresentar

células mortas no sobrenadante das garrafas infectadas e aparente lesão à monocamada, o sobrenadante das culturas foi coletado em tubos estéreis de 50 mL, centrifugados a 300 RCF por 8 minutos e alíquotados em criotubos de 500 µL. As alíquotas foram armazenadas em freezer a -80°C ou nitrogênio líquido para uso posterior.

3.4.6 Titulação dos estoques virais

Para determinação do título de vírus dos estoques preparados, foi utilizado ensaio de citometria de fluxo, baseado na metodologia previamente descrita por Lambeth e colaboradores (122).

No primeiro dia de ensaio, foram plaqueadas 30.000 células Vero em 100 µL de M199-5 por poço, em placas de 96 poços de fundo reto com tratamento para cultura celular (Falcon, Corning Incorporated, EUA). As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 24 horas. No dia seguinte, o meio foi removido das células e elas foram infectadas, em duplicata, com o vírus serialmente diluído em fator de 10, desde o estoque puro até a diluição 10⁻⁵. Também foram preparados poços controle com células e vírus e cada um dos anticorpos utilizados isoladamente, para verificar ligações inespecíficas, assim como um poço controle apenas com células Vero e anticorpos de marcação, sem vírus. Todos os poços continham volume final de 100 µL. As placas foram então incubadas nas mesmas condições, por 90 minutos. Depois desta incubação, o sobrenadante das placas com excesso de vírus foi retirado, colocou-se 150 µL de meio M199-5 em cada poço e as placas foram novamente incubadas por 24 horas.

Após o período estipulado, as células foram coletadas e o vírus foi marcado com anticorpo fluorescente para avaliação da porcentagem de células infectadas. Brevemente, a monocamada foi lavada com PBS 1X (LGC Biotecnologia, Brasil) e tratada com tripsina para as células soltarem dos poços. Então, as células foram diluídas em M199-5, transferidas para uma placa de 96 poços de fundo V (NUNC, Dinamarca) e centrifugadas. As células foram então fixadas por 15 minutos a 4°C com Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences, EUA) e lavadas com Perm/Wash™ (BD Biosciences, EUA) 1X, diluído em água destilada. Após lavagens, a placa foi incubada com anticorpo anti-orthoflavivírus (Merck, Alemanha), clone D1-4G2-4-15 (a partir de agora referenciado apenas como 4G2), diluído 1:1000, por uma hora em temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada e incubada com anticorpo secundário IgG2a *anti-mouse* marcado com alofocianina (APC, BioLegend, EUA) diluído 1:200 por 30

minutos. Lavou-se novamente os poços e, por fim, as células foram ressuspensas em 200 µL de Perm/Wash™ (BD Biosciences, EUA) 1X e lidas em citômetro de fluxo LSRCanto™ (BD Biosciences, EUA) no mesmo dia. Para cada amostra, foram coletados pelo menos 20.000 eventos.

Para o cálculo do título viral, primeiro foi determinada a correlação entre as diluições utilizadas e a porcentagem de células infectadas encontradas em cada diluição. Dessa maneira, foi possível verificar o intervalo na qual houve correlação significativa (linear), e utilizar estes valores para o cálculo do título. Para tanto, foi utilizada a seguinte fórmula (122):

$$\text{título (FACS UI/mL)} = \frac{(\text{média \% células } 4G2^+ - \text{média \% células } 4G2^+ \text{CN} \times n \times \text{FD})}{V \text{ vírus}}$$

na qual:

- CN é o controle negativo;
- n é o número de células no poço;
- FACS é sorteamento de células por fluorescência ativada (do inglês, *fluorescence-activated cell sorting*);
- FD é o fator de diluição;
- UI significa unidades internacionais.

3.4.7 Ensaio de neutralização por citometria de fluxo

O ensaio de neutralização por citometria de fluxo (FNT, do inglês *FACS-based neutralization assay*) foi baseado na metodologia proposta por Kraus e colaboradores (123), seguindo protocolo semelhante ao de titulação de vírus.

Inicialmente, foram plaqueadas 30.000 células Vero em 100 µL de M199-5 por poço, em placas de 96 poços de fundo reto com tratamento para cultura celular (Falcon, Corning Incorporated, EUA). As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 24 horas. No dia seguinte, previamente à próxima etapa do ensaio, as amostras de plasma utilizadas foram inativadas em banho-maria a 56°C por 45 minutos, para inativação do sistema complemento. Em uma outra placa de 96 poços, os plasmas inativados foram diluídos serialmente 1:2 com meio M199-5, ficando com volume final de 60 µL, em duplicata. Depois, em todos os poços controles e amostras, foi acrescentado 60 µL de vírus diluído 1:50, de acordo com resultado da titulação anterior. A placa foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por uma hora. As diluições seriadas

finais de plasma variaram entre 1:40 e 1:5120. Após incubação, o meio das placas com as células Vero foi descartado, e foram acrescentados 100 µL da mistura contendo amostra de plasma com vírus diretamente sobre as células, sendo esta placa incubada por 90 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Depois, o sobrenadante foi novamente descartado e sobre as células acrescentou-se 150 µL de meio M199-5. As placas foram incubadas, nas mesmas condições, por 24 horas. No dia seguinte, as células foram coletadas, fixadas, marcadas com anticorpos de acordo com o protocolo de titulação previamente descrito (item 3.4.6) e lidas em citômetro de fluxo.

Para a análise dos dados obtidos na citometria de fluxo, primeiramente o tamanho das células (determinado pelo parâmetro Forward Scatter-Height (FSC-H)) foi cruzado com o tempo, para verificar-se a estabilidade dos lasers do citômetro durante a aquisição. Em seguida, foi realizada a exclusão de *doublets* (agregados de células que, ao passarem no laser, são caracterizados como apenas um evento), utilizando-se um *gate* delimitado na diagonal, com os eixos FSC-H e FSC-A (*Forward Scatter-Area*). A partir desta população de *singlets* (células únicas), foi desenhado um *gate* com base no controle negativo (somente células Vero, sem presença de vírus) para delimitar onde as células com presença de vírus (positivas para o fluorocromo APC (aloficocianina, do inglês *allophycocyanin*) APC⁺) estariam localizadas. Os resultados foram calculados como a porcentagem de células Vero positivas para APC nas amostras com vírus, subtraindo-se o *background* da célula vero não infectada. Foram coletados no mínimo 10.000 eventos de todas as amostras lidas.

A taxa máxima de concentração viral (100%) foi calculada com base no controle de células Vero com o vírus, sem a presença de amostra, representando o crescimento viral sem qualquer neutralização por anticorpos. Para calcular a porcentagem de neutralização de cada ponto, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ neutralização} = 100 - \left(100 * \frac{\text{média da duplicata} - \text{Vero}}{\text{valor do } \textit{mock} - \text{Vero}} \right)$$

na qual:

- Vero é o valor de background das células Vero 4G2⁺, sem presença de vírus;
- *Mock* é a porcentagem de células 4G2⁺, nos poços com vírus e sem amostras.

Com base nos valores de neutralização e no log das diluições, foi construída uma curva sigmoideal de quatro parâmetros para cada indivíduo, que foi o modelo estatístico que mais se ajustou à distribuição dos dados. A partir dela, foi possível extrapolar o valor da diluição da amostra na qual 50% dos vírus são neutralizados. Uma amostra controle foi incluída juntamente com as outras em todos os ensaios, para verificar a reprodutibilidade entre os ensaios. O valor mínimo foi definido como a menor diluição realizada (1:40), e esse foi considerado o limite de detecção do ensaio.

3.5 Detecção do RNA viral

A detecção do RNA viral foi realizada para se confirmar o diagnóstico de febre amarela nos pacientes com quadro suspeito, e os dados também foram utilizados para identificar amostras com altas cargas virais para o isolamento e sequenciamento dos vírus.

A extração e quantificação do RNA viral foram realizados no Laboratório de Virologia da FMUSP, conforme protocolo descrito por Kallás e colaboradores (36). Brevemente, o RNA viral foi extraído de 500 µL de plasma coletado dos pacientes da coorte, por meio de uma plataforma automatizada NucliSENS easyMag (Biomérieux, Brasil). Após a extração, o RNA foi eluído e utilizado para fPCR com transcriptase reversa com iniciadores e sondas que permitiram detecção viral e diferenciação entre os vírus vacinal e selvagem. A partir de uma curva padrão construída com a cepa YFV 17DD, foi possível interpolar a carga viral das amostras analisadas. As duas cepas, selvagem e vacinal, foram investigadas com a mesma metodologia. Os valores foram obtidos em cópias/mL, e transformados em logPFU/mL por meio da fórmula:

$$\frac{\text{Cópias}}{\text{mL}} = \left(\frac{\log_{10}\text{PFU}}{\text{mL}} + 2,807 \right) / 0,974$$

Foram analisadas amostras dos pacientes em diversos períodos, variando entre quatro e 14 dias após o início dos sintomas (D4-D14), utilizando-se a primeira amostra coletada na admissão do paciente no hospital e coletas periódicas até a carga viral ser indetectável.

3.6 Sequenciamento viral

A maioria dos pacientes infectados com o YFV selvagem que relatou vacinação prévia não a recebeu dentro do esquema padrão de vacinação. Alguns indivíduos reportaram vacinação poucos dias antes do início dos sintomas, no mesmo dia ou até mesmo depois dos sintomas terem se iniciado. Sendo assim, é muito provável que, nesses indivíduos, o vírus selvagem tenha circulado ao mesmo tempo que o vírus atenuado vacinal. Portanto, para avaliar se a presença do vírus vacinal poderia impactar na cepa selvagem causando recombinação viral, os vírus de pacientes infectados e vacinados foram isolados e sequenciados.

Para tanto, foram selecionadas para o sequenciamento algumas amostras de indivíduos infectados vacinados, baseando-se na carga viral plasmática, elegendo-se aquelas que apresentaram maior viremia. Além disso, não foram considerados os indivíduos que foram vacinados no mesmo dia do início dos sintomas e depois do início dos sintomas, por conta do tempo de incubação do vírus selvagem, que no início dos sintomas já possuíam carga viral em decaimento, havendo pouco tempo para a interação entre as duas cepas. Sendo assim, foram escolhidos três indivíduos: um com vacina um dia antes do início dos sintomas, um com quatro dias e outro com seis dias antes do início dos sintomas. Além da maior carga viral e do intervalo entre vacinação e início dos sintomas, também foram consideradas as amostras com quantidade disponível e suficiente para o isolamento e sequenciamento viral. A obtenção do material genético, preparação e sequenciamento viral foi realizada pela equipe da Dra Myrna C. Bonaldo, da Fiocruz/RJ, de acordo com protocolo publicado previamente (81). As sequências foram montadas no programa Geneious Prime 2023.2.1 (www.geneious.com) com base em um genoma de referência. Posteriormente, foram alinhadas com diversas sequências de febre amarela (Apêndice A) utilizando-se o programa MAFFT (124) com as configurações automáticas e editadas no programa AliView versão 1.28 (125). Durante a montagem dos genomas, para investigar a presença do vírus vacinal nas amostras, foram buscadas as sequências de *primers* utilizadas para a diferenciação das cepas selvagem e vacinal nas qPCRs, conforme descrito por Fischer e colaboradores (126). Nas regiões correspondentes aos *primers*, também foram avaliados os cromatogramas, para busca de sinal duplo em regiões que pudessem discriminar as duas cepas.

3.7 Análise das sequências virais

Para estabelecer a relação entre as cepas isoladas de indivíduos infectados por febre amarela, vacinados ou não, com as cepas circulantes no país e cepas vacinais, foi necessário realizar análise filogenética das sequências obtidas. As análises foram baseadas em trabalhos publicados por Bonaldo e colaboradores (81) e Engel e colaboradores (68).

Para tanto, primeiramente foram selecionadas sequências do YFV da região sudeste do país, entre os anos de 2017 e 2019, de seres humanos e de primatas não-humanos do gênero *Alouatta* sp (127). As sequências escolhidas foram baseadas nos trabalhos publicados por Delatorre e colaboradores (128) e Claro e colaboradores (129). Também foram acrescentadas sequências mais antigas, para comparação com a cepa circulante no surto recente, sequências isoladas de artrópodes hospedeiros, a cepa ancestral Asibi, as cepas vacinais 17DD-Brazil e 17D-204 e cepas provenientes de indivíduos que desenvolveram a YEL-AVD. A lista completa das sequências utilizadas, bem como seus códigos de acesso e informações, está apresentada no Apêndice A.

As sequências foram alinhadas com o programa MAFFT (124), com as configurações automáticas, inspecionadas manualmente e editadas no programa AliView (125). A árvore filogenética foi gerada pelo método de máxima verossimilhança, pelo programa IQTREE (130,131), com análise de *bootstrap* ultrarápida (132), com 1000 replicatas. Os modelos de substituição para as diferentes inferências filogenéticas foram escolhidos automaticamente pelo IQTREE, de acordo com o *Bayesian information criterion*. A visualização e edição das árvores foi realizada no programa FigTree v1.4.4 (133).

3.8 Análise dos resultados

Os resultados de citometria de fluxo foram analisados no programa FlowJo versão 9.9.6 e as análises estatísticas foram realizadas nos programas R versão 4.0 (134) e GraphPad® Prism 9.4.1 (GraphPad Programa, San Diego, CA).

Para as análises de títulos de anticorpos, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar o título de anticorpos entre infectados e infectados e vacinados, e o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar todos os grupos entre si. Para as análises de correlação foi utilizado o teste não-paramétrico de Spearman. Para as análises de carga viral, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, que permitiu comparar os grupos infectado e infectado

e vacinado em cada ponto de coleta. Em todos os casos, as diferenças que apresentaram o valor de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coorte

4.1.1 Dados demográficos gerais

Os dados demográficos e clínicos foram coletados de todos os pacientes com confirmação de infecção pelo YFV. Na Tabela 3, os pacientes foram separados entre infectados/vacinados (IV) e infectados/não vacinados (INV), com base no relato de vacinação com data próxima ao início dos sintomas. Essa primeira divisão foi realizada para verificar se a presença de vacinação poderia alterar os dados clínicos dos pacientes infectados.

A mediana de idade dos dois grupos é semelhante, bem como a distribuição entre homens e mulheres, sendo a maioria dos pacientes homens em ambos. O grupo IV buscou atendimento médico mais precocemente do que o grupo INV (dias de sintomas na inclusão do estudo, $p < 0,05$), mas o tempo de internação não variou entre os grupos. Sobre essa informação, o protocolo dos hospitais na época era admitir todos os casos confirmados de febre amarela na UTI e com a sua melhora eles eram transferidos para a enfermaria. No entanto, não foi encontrado no prontuário dos pacientes a informação de alta da UTI e tempo de enfermaria, por isso o tempo de internação acima descrito refere-se ao tempo total que os pacientes permaneceram no hospital, independentemente do local e da gravidade.

Os pacientes IV apresentaram menor contagem de leucócitos totais ($p < 0,05$), bilirrubina total ($p < 0,05$), bilirrubina direta ($p < 0,05$) e creatinina ($p < 0,0001$), mas números mais elevados de plaquetas ($p < 0,01$). Em contrapartida, o grupo INV conteve um número muito maior de óbitos ($n = 25$) em comparação com o grupo que recebeu uma dose de vacina próximo ao início de sintomas relacionados à infecção ($n = 2$). Dessa maneira, ao se calcular a taxa de letalidade com base na vacinação, esta foi de 45,5% no grupo INV e de apenas 11,1% nos IV. Entre os óbitos, o tempo até o desfecho não foi diferente entre os grupos, porém como no grupo IV havia apenas dois indivíduos com variação muito ampla (7 e 21 dias), esse dado deve ser interpretado com cautela. Nesse aspecto, é importante ressaltar a provável existência de variabilidades individuais e suscetibilidades dos indivíduos a um pior prognóstico mas, ainda assim, é interessante o fato de haver menos óbitos no grupo de IV quando comparado ao de INV.

Tabela 3. Informações demográficas e dados clínicos sobre a coorte de pacientes infectados com febre amarela.

	Infectados/vacinados (n = 18)	Infectados/não vacinados (n = 55)	p-valor
Idade (anos)	39 (24-45)	45 (34-57)	0,0563
Sexo			
Feminino	3 (16,7%)	4 (7,3%)	-
Masculino	15 (83,3%)	51 (92,7%)	-
Etnia			
Amarela	0 (0,0%)	2 (3,6%)	-
Branco	7 (38,9%)	35 (63,6%)	-
Preto	1 (5,5%)	1 (1,8%)	-
Pardo	10 (55,5%)	16 (29,1%)	-
Não informado	0 (0,0%)	1 (1,8%)	-
Dias de sintomas na inclusão	7 (5-8)	8 (7-10)	0,0253*
Tempo de internação (dias)	8 (4,8-17,2)	7 (5-11)	0,6316
Óbitos	2 (11,1%)	25 (45,5%)	-
Tempo até o óbito (dias) [†]	14 (7-21)	10 (7-12,5)	0,8348
Leucócitos totais/ μ L	3.470,0 ^a (2.185,0-5.075,0)	4.300,0 ^c (3.105,0-6.055,0)	0,0430*
Linfócitos/ μ L	900,0 ^a (650,0-1.330,0)	990,0 ^c (610,0-1.585,0)	0,3821
Neutrófilos/ μ L	1.640,0 ^a (1.000,0-3.645,0)	2.810,0 ^c (1.590,0-4.795,0)	0,0533
Plaquetas/ μ L	114.000,0 ^b (79.000,0-146.500,0)	68.000,0 ^d (45.000,0-96.500,0)	0,0068**

Continua na próxima página

Continuação

	Infectados/vacinados (n = 18)	Infectados/não vacinados (n = 55)	p-valor
Aspartato transaminase (U/L)	1.312,0 ^c (735,3-5.325,0)	3.648,0 ^e (842,0-6.641,0)	0,1414
Alanina metiltransferase (U/L)	1.221,0 ^c (711,3-3.217,0)	2.066,0 ^f (1.151,0-2.813,0)	0,3059
Bilirrubina total (mg/dL)	2,4 ^c (0,9-3,3)	4,6 ^f (1,6-6,2)	0,0116*
Bilirrubina direta (mg/dL)	1,6 ^c (0,6-3,0)	3,9 ^f (1,3-5,4)	0,0149*
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,4 ^c (0,3-0,6)	0,6 ^f (0,2-0,9)	0,1985
Creatinina (mg/dL)	0,8 ^c (0,8-1,1)	2,7 ^g (1,1-4,3)	<0,0001

Os dados estão descritos como mediana (intervalo interquartil) ou n (%). †Em relação ao relato de início dos sintomas. *p <0,05. ** p <0,01.

^aDados faltantes para 1 paciente. ^bDados faltantes para 5 pacientes. ^cDados faltantes para 2 pacientes. ^dDados faltantes para 14 pacientes.

^eDados faltantes para 12 pacientes. ^fDados faltantes para 13 pacientes. ^gDados faltantes para 16 pacientes.

Na Tabela 4, as comparações foram realizadas com base no desfecho da doença (sobrevivência ou óbito). Foram comparados os sobreviventes e óbitos (sobreviventes IV (IVS), sobreviventes INV (INVS), óbitos IV (IVO), óbitos INV (INVO)) dentro de cada grupo e depois entre si. O objetivo foi analisar o perfil dos óbitos vacinados e não vacinados, primeiro para verificar as suas diferenças em relação aos sobreviventes, para depois serem comparados entre si, a fim de verificar se a vacina poderia alterar algum parâmetro clínico que diferenciasse o desfecho da doença ou mudasse o perfil dos pacientes. Em relação ao grupo IV, embora o número de óbitos seja muito baixo ($n = 2$) para se tirar conclusões estatísticas em relação aos sobreviventes, foi possível observar que são homens brancos, com presença de neutrofilia ($p < 0,05$), perfil semelhante ao publicado anteriormente (36). Constatou-se também que os indivíduos IVO buscaram atendimento médico mais rápido (com menos dias de sintomas) e apresentaram medianas maiores para os marcadores clínicos observados. No grupo INV, a quantidade de óbitos é maior, então as diferenças entre eles e os sobreviventes são mais acentuadas. São, em sua maioria, homens brancos com menos dias de sintomas no momento da admissão no hospital, e seus parâmetros clínicos como leucócitos totais, marcadores hepáticos e neutrófilos estavam aumentados. As idades entre INVS e INVO são semelhantes, bem como a distribuição de homens e mulheres. Entre os sobreviventes, os indivíduos do grupo IV buscaram atendimento médico com menos dias de sintomas, mas os parâmetros clínicos de ambos foram semelhantes. Já entre os óbitos (com a ressalva do baixo número de casos no grupo IVO), os indivíduos IV apresentaram número muito maior de plaquetas, enquanto os pacientes do grupo INVO apresentaram níveis mais elevados de creatinina. O tempo de internação dos grupos foi semelhante, porém houve diferença significativa entre os INVS em relação aos INVO. Esses ficaram menos tempo internados, provavelmente devido à gravidade inicial na qual se encontravam, bem como à velocidade da progressão da doença. Com relação aos grupos IV, não houve diferença estatística devido ao baixo número de indivíduos, porém os dois óbitos ficaram internados em durações muito distintas (4 e 18 dias). O óbito com quatro dias de internação foi vacinado no mesmo dia no qual reportou o início dos sintomas, e outro paciente reportou vacina dois dias antes do início dos sintomas.

Tabela 4. Comparação entre os grupos infectados pelo vírus da febre amarela, com e sem vacinação, em relação ao desfecho da doença (sobrevivência ou óbito).

	IVS (n = 16)	IVO (n = 2)	INVS (n = 30)	INVO (n = 25)	Valor de p			
					IVS x IVO	INVS x INVO	IVS x INVS	IVO x INVO
Idade (anos)	39 (21-45)	48 (36-60)	42 (31- 49)	50 (35-63)	0,4183	0,0682	0,2173	0,9060
Sexo								
Feminino	3 (18,8%)	0 (0,0%)	4 (13,3 %)	0 (0,0%)	-	-	-	-
Masculino	13 (81,2%)	2 (100,0%)	26 (86,7 %)	25 (100,0%)	-	-	-	-
Etnia								
Amarela	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (3,3%)	1 (4,0%)	-	-	-	-
Branco	1 (6,2%)	2 (100,0%)	18 (60,0%)	17 (68,0%)	-	-	-	-
Preto	5 (31,2%)	0 (0,0%)	1 (3,3%)	0 (0,0%)	-	-	-	-
Pardo	10 (62,5%)	0 (0,0%)	10 (33,3%)	6 (24,0%)	-	-	-	-
Não informado	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (4,0%)	-	-	-	-
Dias de sintomas na inclusão	7 (6-10)	4,5 (4-5)	9,5 (8-12)	7 (6-9)	0,1111	0,0060**	0,0071**	0,0883
Tempo de internação (dias)	8 (5-17)	11 (4-18)	8 (6-12)	6 (4-9)	>0,9999	0,0163*	0,7851	0,7500

Continua na próxima página

Continuação					Valor de p			
	IVS (n = 16)	IVO (n = 2)	INVS (n = 30)	INVO (n = 25)	IVS x IVO	INVS x INVO	IVS x INVS	IVO x INVO
Leucócitos totais/ μ L	3.100,0 (2.170,0- 4.130,0)	6.885,0 (5.970,0- 7.800,0)	3.580,0 (2.765,0- 4.985,0)	5.645,0 (4.240,0- 12.135,0)	0,0588	0.0006***	0,1507	0,7446
Linfócitos/ μ L	900,0 (600,0- 1.300,0)	1.085,0 (800,0- 1.370,0)	1.070,0 (700,0- 1.570,0)	815,0 (525,0- 1.743,0)	0,5956	0,3769	0,1432	0,6892
Neutrófilos/ μ L	1.600,0 (1.000,0- 2.200,0)	5.530,0 (4.360,0- 6.700,0)	1.800,0 (1.270,0- 2.930,0)	4.795,0 (2.918,0- 9.513,0)	0.0294*	<0,0001****	0,3413	0,8123
Plaquetas/ μ L	112.000,0 (77.000,0- 136.000,0)	146.500,0 (146.000,0- 147.000,0)	68.000,0 (48.000,0- 104.500,0)	71.500,0 (44.500,0- 93.750,0)	0,2308	0,6560	0,0940	0,0087**
Aspartato transaminase (U/L)	947,5 (655,8- 4.543,0)	3.821,0 (1.848,0- 5.793,0)	1.480,0 (500,0- 3.590,0)	6.610,0 (3.913,0- 15.207,0)	0,3333	<0,0001****	0,9362	0,3794

Continua na próxima página

Continuação					Valor de p			
	IVS (n = 16)	IVO (n = 2)	INVS (n = 30)	INVO (n = 25)	IVS x IVO	INVS x INVO	IVS x INVS	IVO x INVO
Alanina metiltransferase (U/L)	1.221,0 (614,5- 3.086,0)	2.997,0 (799,0- 5.194,0)	1.468,0 (966,0- 2.493,0)	2.370,0 (1.634,0- 4.623,0)	0,7000	0,0708	0,7272	0,8617
Bilirrubina total (mg/dL)	1,6 (0,8-3,4)	3,1 (2,9-3,3)	2,2 (0,8-4,9)	5,6 (4,6-7,6)	0,4167	0,0003***	0,4955	0,0519
Bilirrubina direta (mg/dL)	1,2 (0,5-3,2)	2,0 (1,4-2,6)	1,7 (0,5-4,5)	4,6 (3,4-5,6)	0,8167	0,0046**	0,4507	0,0519
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,4 (0,2-0,5)	1,1 (0,7-1,4)	0,3 (0,1-0,5)	0,8 (0,6-2,2)	0,0583	<0,0001****	0,7185	0,8788
Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,8-1,0)	1,0 (0,9-1,3)	1,1 (0,8-1,5)	4,2 (3,1-5,5)	0,7083	<0,0001****	0,0536	0,0087**

Os dados estão descritos como mediana (intervalo interquartil) ou n (%). ns: não significativo. *p <0,05. ** p <0,01. *** p <0,001. **** p <0,0001. IVS: infectados/vacinados sobreviventes. IVO: infectados/vacinados que foram a óbito. INVS: infectados/não vacinados sobreviventes. INVO: infectados/não vacinados que foram a óbito.

4.1.2 Indivíduos infectados e vacinados (grupo IV)

Os indivíduos que reportaram vacinação recente em relação ao início dos sintomas causados pela infecção pelo YFV foram analisados com base no intervalo de dias entre o recebimento do imunizante e o início dos sintomas, além do histórico prévio. É importante ressaltar que os pacientes infectados pela febre amarela, vacinados ou não, não estavam positivos e nem possuíam histórico de infecção pelo DENV, ZIKV ou pelo vírus Chikungunya, segundo relatos pessoais.

Em nossa coorte, todos os indivíduos receberam vacina entre janeiro e fevereiro de 2018 ou em janeiro de 2019. Isso significa que os pacientes recrutados na coorte de 2018 provavelmente receberam a dose fracionada da vacina, uma vez que essa era a formulação disponível vigente no estado de São Paulo (60). Destes, dois indivíduos receberam a vacina com mais de 10 dias de diferença do início dos sintomas, mas a maioria recebeu o imunizante muito próximo do começo dos sinais clínicos da doença, portanto, com viremia do vírus selvagem presente durante a imunização. A Figura 14 mostra a linha do tempo da vacinação dos indivíduos, em relação à data de início de sintomas reportada por eles.

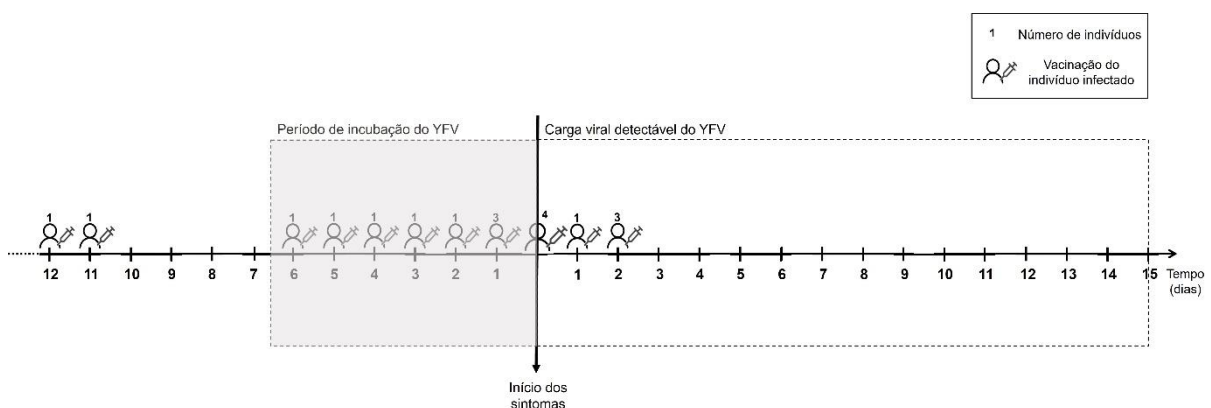


Figura 14. Relação entre a vacinação, dias de sintomas e detecção da viremia em indivíduos infectados e vacinados. A seta para baixo indica o início dos sintomas. A esquerda da imagem indica a quantidade de dias anteriores ao início dos sintomas, e a direita mostra os dias após o início dos sintomas. Os números acima dos indivíduos indicam a quantidade de indivíduos vacinados em cada momento. O quadro cinza indica o período de incubação aproximado do vírus selvagem (YFV), e o quadro branco indica o período aproximado no qual a carga viral de YFV foi detectável.

Como representado na Figura 14, é possível verificar que a grande maioria dos indivíduos foi vacinada provavelmente quando já estava infectada pelo vírus selvagem, seja na fase de incubação ou proliferação do vírus selvagem. Considerando a carga viral vacinal que está presente entre três e sete dias após a imunização (135), com exceção dos dois indivíduos que receberam a vacina 12 e 11 dias antes do início dos sintomas, todos eles

podem ter tido o vírus vacinal circulando simultaneamente à circulação do vírus selvagem, na fase de infecção.

Em relação à progressão da doença (Figura 15), todos os indivíduos foram hospitalizados e conduzidos à UTI, conforme o protocolo para atendimento a pacientes com suspeita de infecção pelo YFV na época. O número divergente de casos nos dois anos se deu pois o vírus começou a circular mais intensamente em São Paulo em 2018, e a maioria da população ainda não estava vacinada. Já em 2019, a cobertura vacinal foi ampliada e ocorreram menos casos e de menor gravidade, havendo menos transferências de hospitais regionais para o Hospital das Clínicas e um menor número de óbitos comparando-se ao mesmo período de 2018.

A média de tempo de hospitalização dos indivíduos IV ($n = 18$) foi de 11,8 dias, com mediana de 8, variando entre 1 e 39 dias (intervalo interquartil = 4,8-17,2). Comparando com o grupo INV ($n = 51$), a média encontrada foi de 10,5 dias, com mediana de 7 e variação entre 2 e 71 dias (intervalo interquartil = 5,0-11,0). Nesse grupo, quatro pacientes não possuíam data de alta no banco de dados. Não houve diferença entre os valores nos dois grupos ($p = 0,6316$).

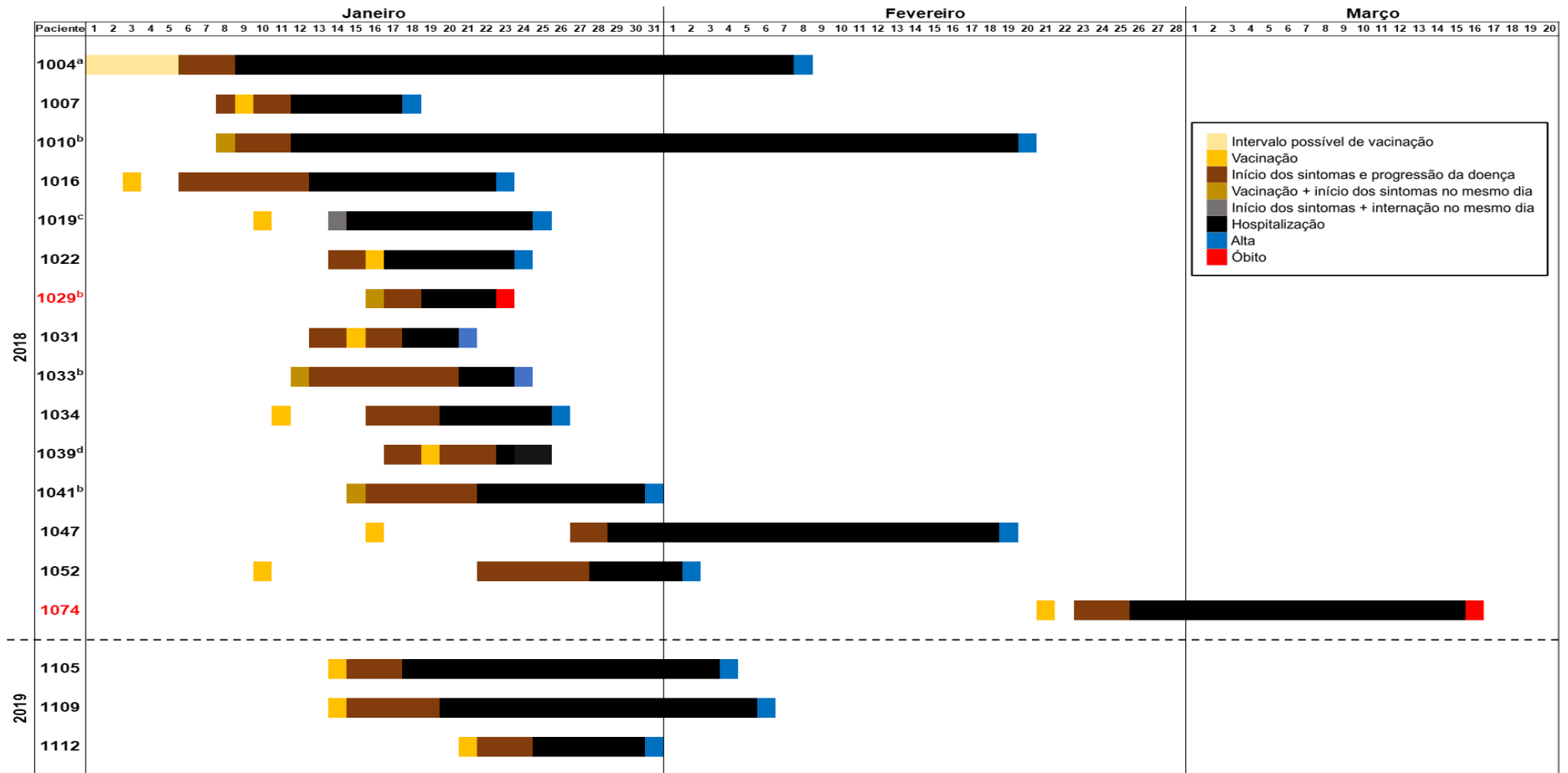


Figura 15. Linhas do tempo dos pacientes que receberam a vacina contra a febre amarela e contraíram da doença silvestre. ^aO paciente não se recordou da data da vacinação, porém disse que foi no mesmo ano do início dos sintomas. ^bA vacinação e o início dos sintomas foram no mesmo dia. ^cO paciente relatou início dos sintomas no mesmo dia no qual foi hospitalizado. ^dO paciente foi transferido para outro hospital.

4.2 Avaliação da resposta humoral

4.2.1 Quantificação de anticorpos totais

A fim de avaliar a resposta humoral na febre amarela e o impacto da vacinação e infecção simultâneas na sua geração, foram quantificados primeiramente os anticorpos totais circulantes, para depois serem quantificados os anticorpos específicos neutralizantes contra o YFV.

A detecção de anticorpos séricos totais dos tipos IgM e IgG teve por objetivo descrever a cinética do seu aparecimento no contexto da infecção pelo YFV selvagem, com presença ou ausência de vacinação. Optou-se por analisar os anticorpos totais pois os pacientes analisados não foram testados para infecções prévias por outros orthoflavivírus como DENV e ZIKV que, por serem muito semelhantes estruturalmente ao YFV, podem gerar anticorpos que apresentam reações cruzadas em ensaios de detecção para outros orthoflavivírus (136). Desse modo, a análise dos anticorpos em diferentes pontos no tempo, comparados com indivíduos sem infecção ativa por YFV ou outros orthoflavivírus, pode gerar um indicativo do papel do vírus e/ou da vacina na cinética dos anticorpos circulantes.

Para o cálculo da concentração dos anticorpos a partir da curva padrão, algumas amostras não puderam ser quantificadas pois os valores de absorbância lidos no ensaio foram muito maiores do que os extrapolados pela curva. Nesses casos, para fins de visualização gráfica e análise estatística, optou-se por atribuir o maior valor de concentração obtido, com base nas outras amostras e na análise da curva. Além disso, foram calculados os *outliers* com a metodologia de ROUT para supressão dos valores discrepantes.

É interessante notar que, apesar de ser um ensaio para detecção de anticorpos totais, é possível visualizar uma curva cinética tanto de IgM (Figura 16A) quanto de IgG (Figura 16B), para ambos os grupos IV e INV. Ambos os anticorpos foram detectados já com quatro dias após o início dos sintomas; como a IgM compõe a resposta humoral primária, ela pode ser detectada logo nos primeiros dias após exposição ao patógeno ou vacinação (137). Em trabalhos que avaliam a produção de IgM específica contra o YFV, sabe-se que ela aparece por volta de 7 a 14 dias após a vacinação, e pode permanecer detectável por até quatro anos (138). Considerando que quando os sintomas se manifestaram o vírus selvagem já estava em incubação, e que na maioria dos casos IV receberam o imunizante antes do início dos sintomas, essa detecção precoce de IgM pode ser por conta do YFV.

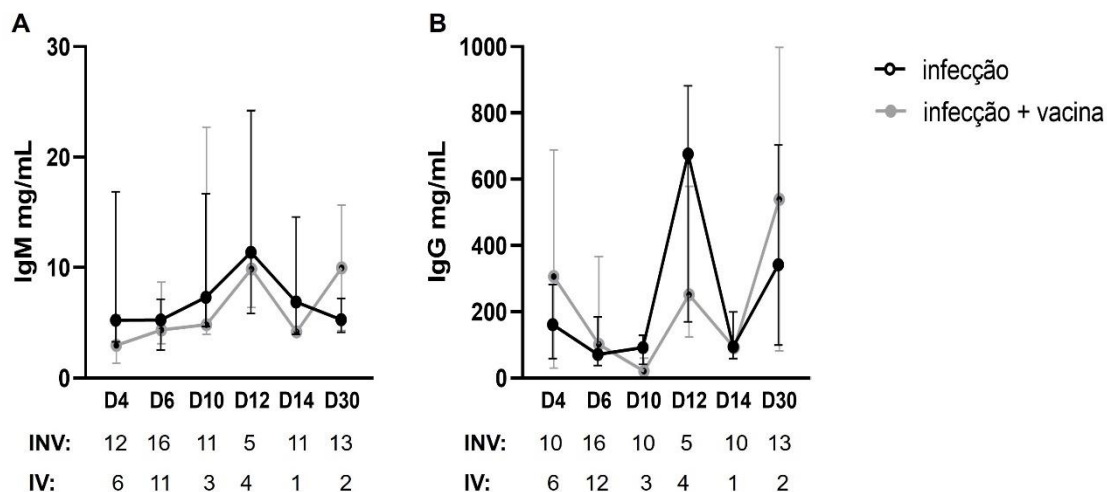


Figura 16. Cinética de anticorpos totais em pacientes infectados com o vírus da febre amarela. Os níveis de anticorpos em mg/mL foram quantificados a partir das curvas-padrão específicas para cada ensaio. (A) Concentração de IgM ao longo do tempo (dias de sintomas, D) em pacientes infectados/não vacinados (INV, preto) e infectados/vacinados (IV, cinza). (B) Concentração de IgG ao longo do tempo (dias de sintomas, D) em pacientes INV (preto) e IV (cinza). Os valores de n de cada grupo de pacientes estão representados abaixo das respectivas coletas. Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil.

Além disso, a concentração de IgM aumenta ao longo do tempo, com um pico 12 dias após o início dos sintomas, condizendo com a cinética dos anticorpos na infecção pelo YFV, conforme descrito previamente (1,49,111). Com a infecção ativa, os níveis de IgM totais podem ter aumentado por conta da maior presença de anticorpos IgM anti-YFV. Nos indivíduos IV, a mediana de concentração de IgM foi um pouco menor quando comparada ao grupo INV, porém sem diferença significativa.

O pico de IgM no grupo IV foi observado no 12º dia, sendo que apenas um indivíduo IV apresentou concentração muito mais elevada no dia 30, contribuindo para que a mediana do grupo apresentasse valor maior do que o grupo INV nesta data. Este paciente em questão recebeu a vacina três dias antes do início dos sintomas e teve seus anticorpos quantificados apenas nos pontos D4 e D30, portanto não é possível saber qual foi o seu pico de produção de IgM ou se já possuía valores elevados em outras visitas.

Quanto aos níveis de IgG, os valores totais encontrados foram mais elevados do que os de IgM, o que é esperado já que a IgG é uma das proteínas mais abundantes no plasma (137). Ela também foi identificada em ambos os grupos na primeira coleta, já no quarto dia de sintomas, e apesar de terem uma meia-vida média de 20 a 30 dias, IgGs específicas contra patógenos ou vacinas podem ser detectadas por décadas, como no caso da febre amarela (1).

A cinética da IgG é similar àquela observada para a IgM, com um ápice de resposta observado por volta de 12 dias após o início dos sintomas, sugerindo o início da produção de anticorpos específicos contra o YFV, que foram somados à quantidade total de IgG circulante. Nesse caso, como a IgG aumenta gradativamente ao longo de um mês da infecção ou imunização (49,111,139), é possível que se houvesse mais coletas de plasma para além do dia 30, fosse possível observar um pico posterior de IgG mais elevado. Ainda, o grupo de indivíduos IV apresentou maior mediana de IgG já no quarto dia de sintomas, e provavelmente esse valor foi influenciado pelos níveis aumentados detectados em um indivíduo que apresentou concentração muito maior do que os outros do mesmo grupo. Essa diferença nos níveis de IgG entre os grupos IV e INV não foi significativa em D4 e nos demais pontos avaliados, sugerindo uma variabilidade individual deste paciente.

É importante ressaltar que, muito embora a IgM e IgG detectadas possuam cinética semelhante, elas não se correlacionam entre si (Figura 17), pois a sua produção é independente uma da outra (138).

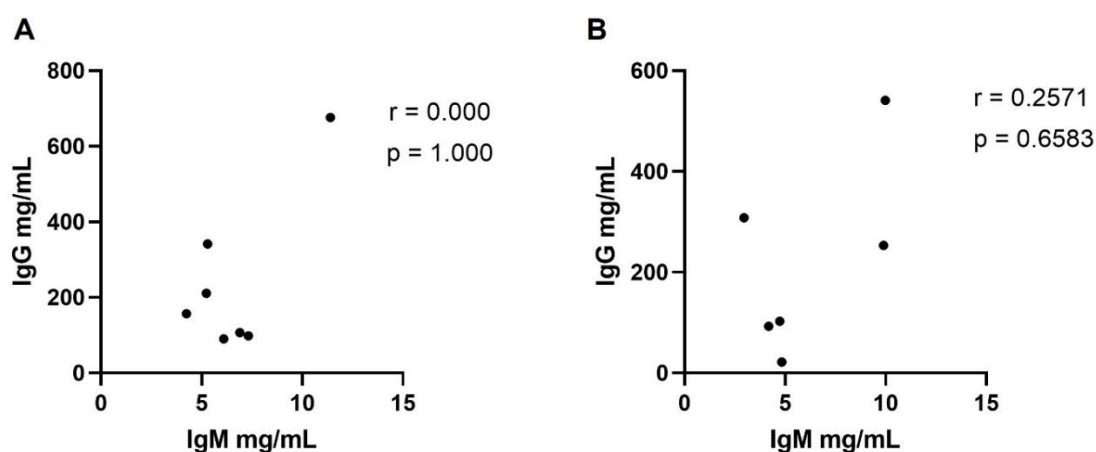


Figura 17. Gráficos de correlação entre título de anticorpos totais. (A) Correlação entre concentrações de IgM e IgG produzidas por pacientes infectados pelo vírus da febre amarela. (B) Correlação entre concentrações de IgM e IgG produzidas por pacientes infectados pelo vírus da febre amarela e vacinados com a formulação YFV 17DD. Os valores dos coeficientes de Spearman (r) e do valor de p estão descritos ao lado de cada respectivo gráfico.

Em relação à comparação entre indivíduos INV e IV, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa nas concentrações de IgM (Figura 18A) ou IgG (Figura 18B). A vacina concomitante à infecção não parece ter tido impacto na concentração total de anticorpos dentro dos grupos, uma vez que a variabilidade individual foi muito grande entre os pacientes, em ambos os grupos. No entanto, esses resultados sugerem que o imunizante não prejudicou a resposta humoral dos indivíduos,

ao menos a nível de resposta total. Os pacientes que foram a óbito (destacado em vermelho na Figura 18) também apresentaram níveis variados de Igs, sendo que a maior parte não havia recebido a vacinação.

Uma última avaliação foi realizada nos indivíduos IV, para analisar a sua variabilidade de resposta ao longo do tempo. Como em alguns pontos na curva de IgG os níveis de anticorpos estavam mais elevados neste grupo, foi avaliado se esse aumento aconteceu em decorrência de um aumento global do grupo, ou a um aumento pontual de alguns indivíduos. Em relação à IgM (Figura 19A), a maior parte dos indivíduos começou com níveis baixos e aumentou ao longo do tempo, enquanto outros se mantiveram estáveis, não impactando na cinética da resposta. Mesmo alguns indivíduos obtendo um *fold change* muito elevado (por terem apresentado uma concentração baixa de IgM no início) a concentração final não foi tão elevada.

Interessantemente, pode-se também observar que a maioria dos indivíduos que tiveram altos níveis de IgM detectados foram os mesmos que tiveram detecção de altos níveis de IgG (Figura 19B), enquanto outros indivíduos que apresentaram níveis baixos já na primeira coleta, não tiveram um aumento muito grande na última coleta. Essas diferenças não parecem ter relação com o intervalo de tempo entre a data da vacinação e o início dos sintomas, uma vez que não foi encontrado um padrão de aumento no nível de anticorpos nos subgrupos avaliados. O único caso de óbito avaliado neste grupo, o indivíduo 1074, teve um *fold change* negativo na quantificação de IgG, o que significa que teve uma concentração de anticorpos totais menor na segunda visita avaliada do que na primeira. Isso pode ser uma característica individual do paciente, o que pode ter contribuído com sua resposta piorada à doença, como já relatado em casos de sepse (140). Já o indivíduo 1019, que também apresentou *fold change* negativo para IgG, recebeu a vacina quatro dias antes do início dos sintomas, sugerindo que o pico da produção de anticorpos possa ter sido anterior às datas analisadas, uma vez que a quantificação foi realizada nos dias 4 e 6 de sintomas. Considerando o intervalo mais longo de produção de IgG do que de IgM (1), na sua primeira coleta já haviam se passado aproximadamente 10 dias da vacinação, então a produção de imunoglobulinas desencadeada pela vacina pode ter ocorrido previamente, enquanto os anticorpos específicos contra o vírus selvagem ainda se encontravam em ascendência.

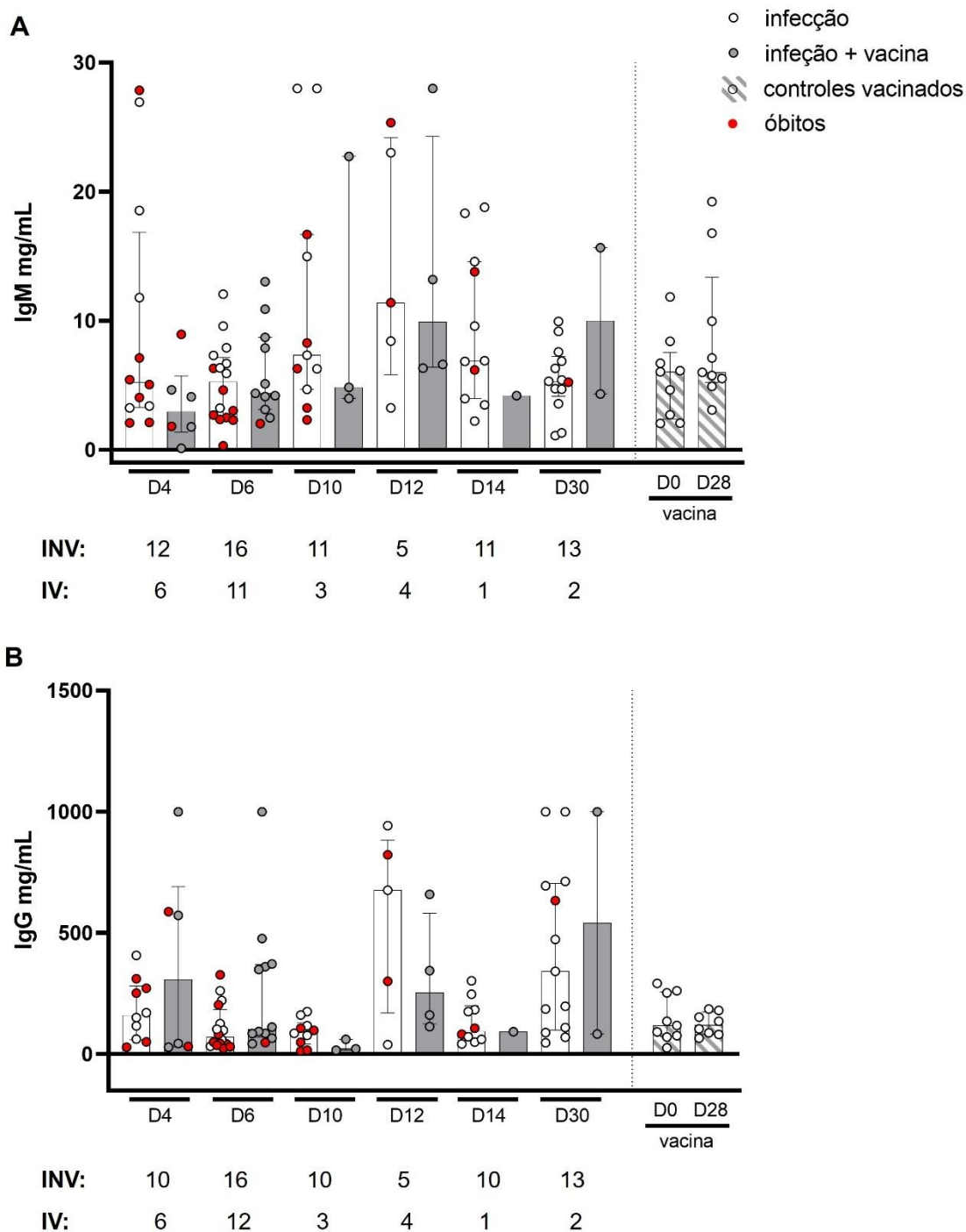


Figura 18. Quantificação de anticorpos totais em pacientes infectados com o vírus da febre amarela. Os níveis de anticorpos em mg/mL foram quantificados a partir das curvas-padrão específicas para cada ensaio. (A) Concentração de IgM ao longo do tempo (dias de sintomas, D) em pacientes infectados (branco) e infectados e vacinados (cinza). (B) Concentração de IgG ao longo do tempo (dias de sintomas, D) em pacientes infectados (branco) e infectados e vacinados (cinza). Os óbitos estão marcados em vermelho. Os controles vacinados não infectados estão marcados em branco e cinza, e os dias identificados são referentes ao intervalo antes (D0) e após (D28) da vacinação. Os valores de n de cada grupo de pacientes estão representados abaixo das respectivas coletas. Foram utilizadas 9 amostras de indivíduos controles, tanto no D0 quanto no D28. Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil.

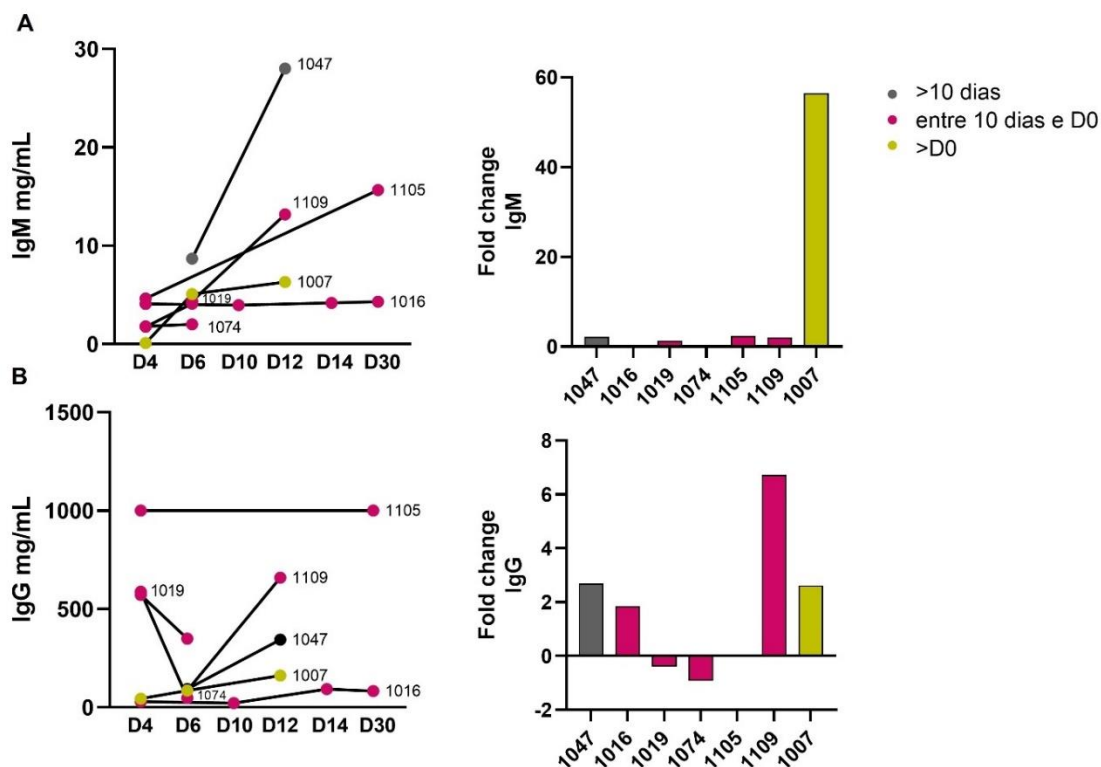


Figura 19. Cinética e *fold change* da quantificação de anticorpos totais em indivíduos infectados pelo vírus da febre amarela e vacinados com a formulação YFV 17DD. (A) Quantificação de IgM total, em mg/mL, e respectivo *fold change*. (B) Quantificação de IgG total, em mg/mL, e respectivo *fold change*. Os números codificados dos indivíduos estão apresentados próximos aos seus dados individuais. O *fold change* foi calculado como (valor da última coleta – valor da primeira coleta)/valor da primeira coleta. >10 dias: vacinação há mais de 10 dias antes do início dos sintomas (D0). Entre 10 dias e D0: vacinação há menos de 10 dias do início dos sintomas, até o D0. >D0: vacinação após o início dos sintomas.

4.2.2 Detecção de anticorpos neutralizantes

Para avaliar os anticorpos específicos contra o YFV que tivessem capacidade de neutralização, foi realizado ensaio *in vitro* com amostras de plasma dos pacientes e a cepa vacinal 17DD, ensaio padrão para a detecção de anticorpos neutralizantes contra o YFV. Neste teste, é possível verificar a ligação de anticorpos presentes no plasma do paciente diretamente no YFV, por meio da sua entrada ou bloqueio em células permissivas para orthoflavivírus.

Para essa análise, foram selecionados indivíduos infectados com histórico de vacinação que possuíam amostras de plasma disponíveis no período no qual já poderia haver resposta detectável de anticorpos específicos (entre D10 e D14). Dos 18 pacientes na coorte inicial, foram excluídos quatro por não haver amostras disponíveis, totalizando uma coorte final de 14 pacientes. A partir deste grupo, foram selecionados

15 pacientes com infecção pelo YFV selvagem sem vacinação, pareados por sexo, idade e dias de sintomas.

Para fins de validação do ensaio e comparação com os grupos, também foram analisados indivíduos não infectados e sem histórico de vacinação contra a febre amarela, além de ausência de histórico de infecções prévias pelo YFV (grupo controle pré-vacinação), bem como indivíduos sem infecção e com uma dose completa de vacina atenuada 17DD, com amostra coletada 28 dias após a vacinação (grupo controle pós-vacinação). Os dois grupos também foram pareados por sexo e idade, entre si e entre os infectados. A descrição dos grupos cujas amostras foram selecionadas para a mensuração de anticorpos neutralizantes encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5. Descrição dos grupos utilizados para os ensaios de neutralização.

	Indivíduos infectados		Indivíduos controles	
	Vacinados (n = 14)	Não vacinados (n = 15)	Pré- vacinação (n = 5)	Pós- vacinação (n = 14)
Idade (anos)	42,5 (27,2-46,2)	42,0 (31,0-49,0)	31,0 (26,5-44,5)	30,50 (28,5-41,0)
Sexo				
Feminino	2 (14,3%)	3 (20,0%)	3 (60,0%)	8 (57,1%)
Masculino	12 (85,7%)	12 (80,0%)	2 (40,0%)	6 (42,9%)
Etnia				
Branca	5 (35,7%)	9 (60,0%)	4 (80,0%)	13 (92,8%)
Não-branca	9 (64,3%)	6 (40,0%)	1 (20,0%)	1 (7,2%)
Dias desde o início dos sintomas	6,5 (5,0-8,5)	8,0 (7,0-9,0)	-	-

Os dados estão descritos como número total (%) ou mediana (intervalo interquartil).

A estratégia de análise dos dados da citometria está exemplificada na Figura 20. A Figura 21 mostra um exemplo de resultado de neutralização com o vírus 17DD, com base na estratégia de análise descrita no item 3.4.7 da seção Métodos.

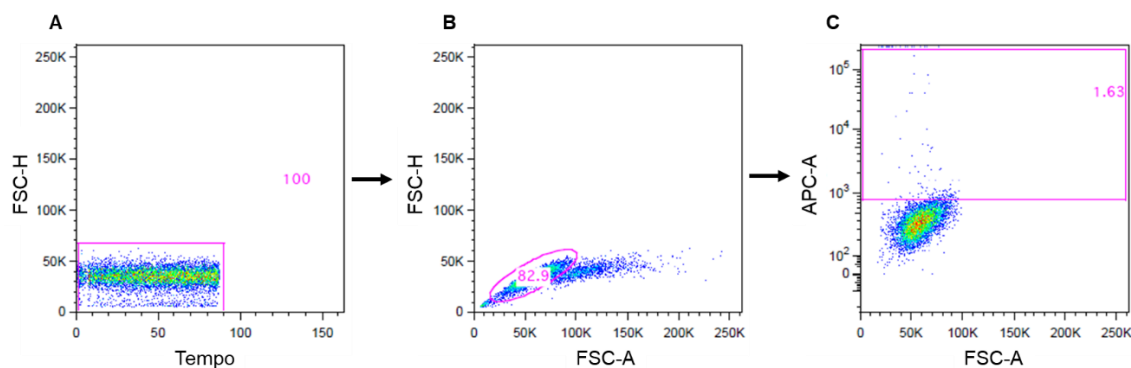


Figura 20. Estratégia de análise para visualização de células 4G2⁺APC⁺. O controle negativo é composto apenas por células Vero sem infecção, porém marcadas com anticorpos primário e secundário. (A) As células foram selecionadas pelo tamanho e tempo, para demonstrar a estabilidade do *laser* do citômetro de fluxo durante a aquisição. (B) O *gate* FSC-H x FSC-A foi utilizado para selecionar apenas as células únicas (*singlets*). (C) Dentro do grupo de células únicas, identificou-se o nível de marcação do APC (no eixo y) que indica as células APC⁺.

Para confirmar a geração de resposta específica contra a febre amarela, os grupos controle pós-vacinação, INV e IV tiveram títulos de anticorpos mais altos do que os indivíduos pré-vacinação (Kruskal-Wallis, $p < 0,0057$, $p < 0,0183$ e $p < 0,0002$, respectivamente), demonstrando a indução de resposta humoral tanto pela vacina quanto pela infecção natural (Figura 22). Além disso, o controle vacinado apresentou título de anticorpos semelhante ao grupo INV ($p = 0,7203$), com uma média geométrica ligeiramente maior ($675,8 \pm 3,3$ contra $622,1 \pm 1,7$, respectivamente) corroborado com os dados de potente resposta imune humoral induzida pela vacina (48).

No entanto, o grupo de pacientes IV apresentou títulos de anticorpos maiores do que o grupo INV (médias geométricas com desvio-padrão $1167,0 \pm 2,2$ e $622,1 \pm 1,7$, respectivamente; teste de Mann-Whitney com valor de $p < 0,0270$). Como o valor médio foi muito superior aos encontrados para os controles pós-vacinação e pacientes infectados, isso pode sugerir que a vacinação, ainda que recente nestes indivíduos, foi capaz de induzir anticorpos específicos contra o YFV 17DD da vacina, que foram somados aos anticorpos contra a cepa selvagem. Para essas análises, foram omitidos um controle pós-vacinação, um paciente infectado e dois infectados vacinados, considerados *outliers* pelo método estatístico ROUT.

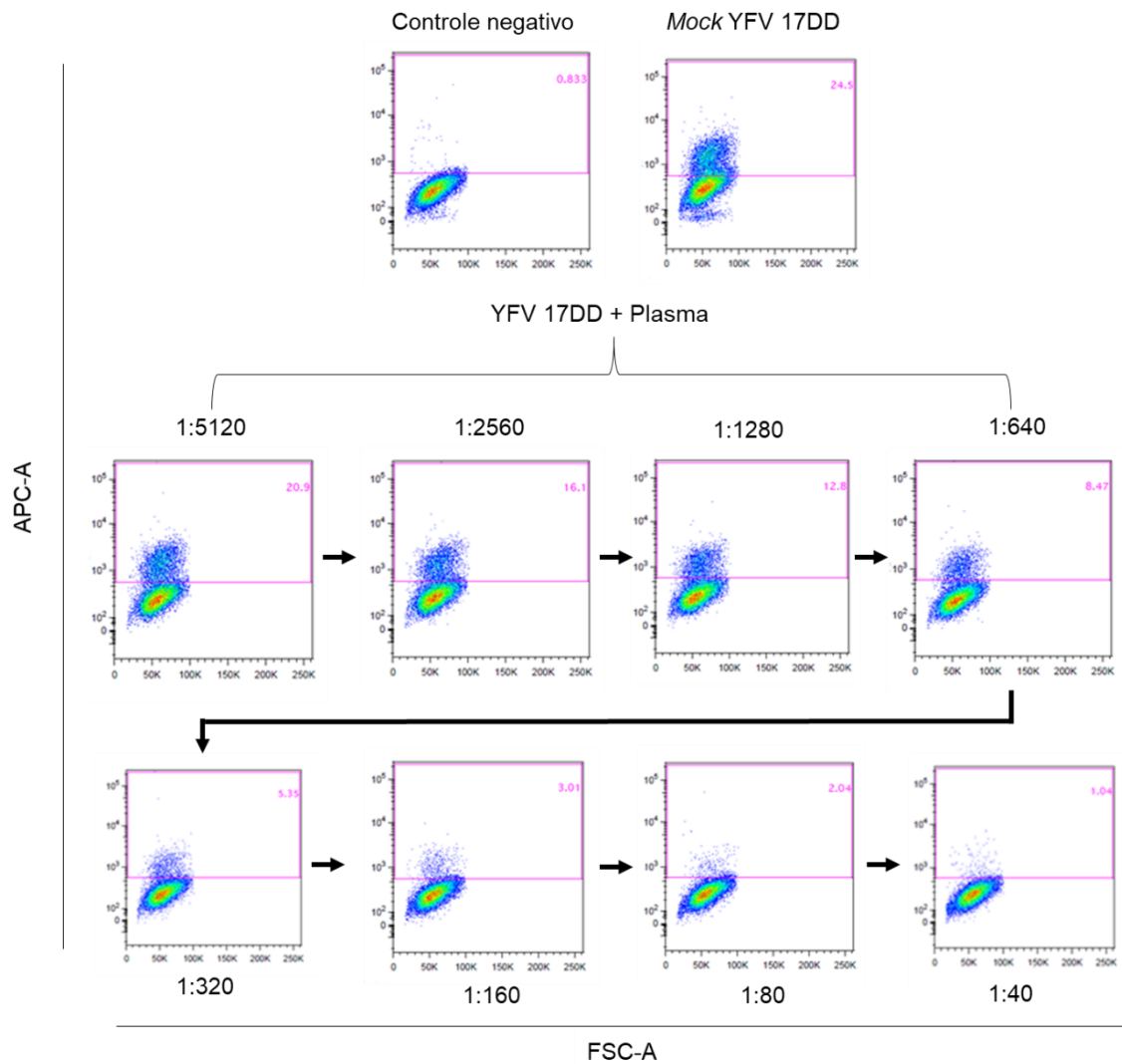


Figura 21. Representação dos resultados obtidos após ensaio de neutralização por citometria de fluxo com YFV 17DD e plasma de paciente infectado com YFV selvagem. O controle negativo representa apenas células Vero, sem presença de vírus, e o *mock* representa o potencial total de infecção dos vírus nas células Vero, sem a amostra de plasma. Com adição de amostra de plasma de paciente infectado, após 30 dias do início dos sintomas, é possível observar a neutralização progressiva do vírus. Em uma diluição alta da amostra (1:5120), a quantidade de células positivas é próxima à do *mock*. Conforme a quantidade de anticorpos neutralizantes vai aumentando, ou seja, a amostra vai sendo menos diluída, a quantidade de células positivas diminui para valor próximo de 0 (1:40).

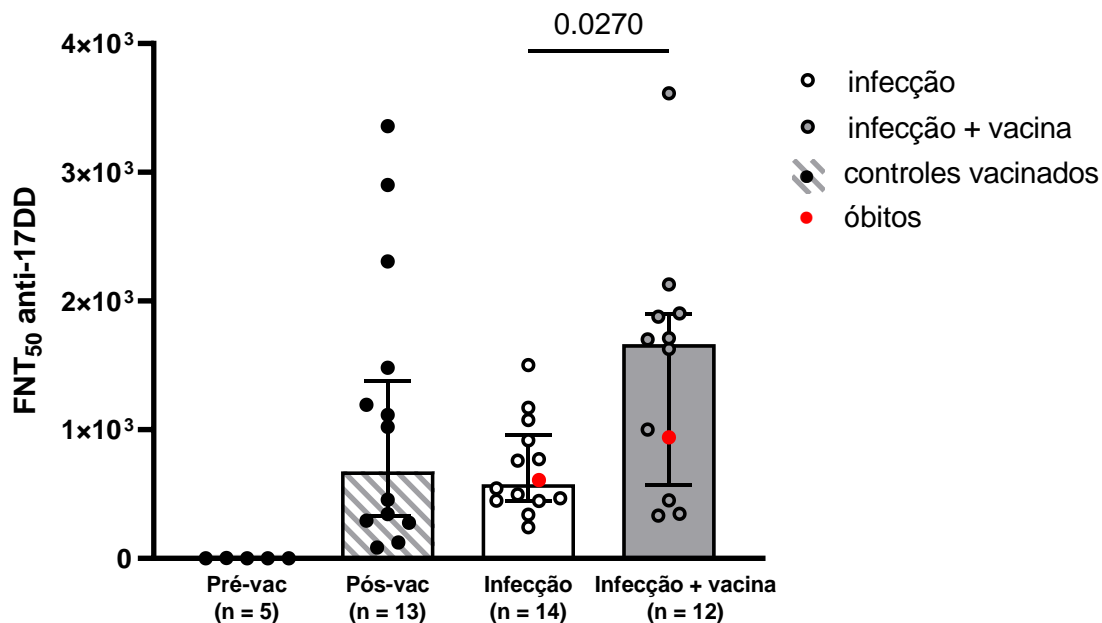


Figura 22. Comparação da resposta de anticorpos neutralizantes contra a cepa vacinal YFV 17DD. O título de anticorpos neutralizantes no plasma foi calculado como FNT_{50} , ou seja, a quantidade de anticorpos suficiente para neutralizar 50% dos vírus no ensaio de neutralização por FACS (FNT, do inglês *FACS-based neutralization assay*), em uma curva de dose-resposta sigmoideal de 4 parâmetros. Os diferentes grupos estão destacados na gradação de cinza das barras e pontos (controles vacinados, nas coletas pré e pós-vacinação, infecção e infecção + vacina, respectivamente), e os óbitos estão destacados em vermelho. Os resultados estão apresentados em média geométrica com intervalo de 95% de confiança. A análise estatística entre o grupo infectado e infectado vacinado não-pareada foi realizada com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com intervalo de confiança de 95%. Foi considerada diferença estatisticamente significativa o valor de $p < 0,05$.

Para conferir se essa diferença vista nos pacientes vacinados (IV) poderia ser proveniente especificamente da cepa YFV 17DD, o ensaio foi repetido com as mesmas amostras, contra uma cepa de YFV selvagem, chamada YFV ES-504, que foi isolada a partir de uma amostra de PNH infectado encontrado na região Sudeste na época do surto e da coleta das amostras avaliadas neste estudo. O objetivo foi verificar se o perfil de neutralização seria o mesmo observado para a cepa vacinal, o que poderia indicar que os pacientes avaliados poderiam produzir mais anticorpos constitutivamente. A estratégia de análise para o vírus selvagem foi a mesma utilizada para o vírus vacinal e está apresentada no apêndice B. Para a construção do gráfico, foram excluídos dois indivíduos controles pós-vacinação e três IV, considerados *outliers*.

Interessantemente, não foi encontrada diferença no título de anticorpos entre os grupos INV e IV contra a cepa ES-504 (Figura 23), ainda que ambos os grupos possuam maior título em comparação ao grupo controle vacinado (Mann-Whitney, $p = 0,0005$ e $p = 0,0003$, respectivamente).

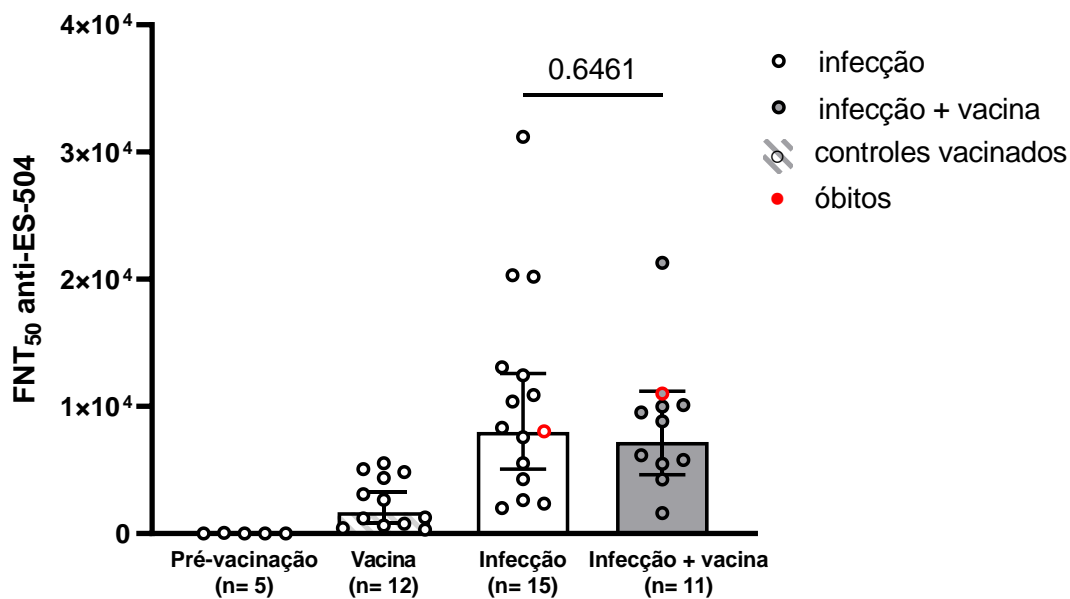


Figura 23. Comparação da resposta de anticorpos neutralizantes contra a cepa selvagem YFV ES-504. O título de anticorpos neutralizantes no plasma foi calculado como FNT_{50} , ou seja, a quantidade de anticorpos suficiente para neutralizar 50% dos vírus no ensaio de neutralização por FACS (FNT, do inglês *FACS-based neutralization assay*), em uma curva de dose-resposta sigmoidal de 4 parâmetros. Os diferentes grupos estão destacados na gradação de cinza das barras e pontos (pré-vacinação, vacina, infecção e infecção + vacina, respectivamente), e os óbitos estão destacados em vermelho. Os resultados estão apresentados em média geométrica com intervalo de 95% de confiança. A análise estatística entre o grupo infectado e infectado vacinado não-pareada foi realizada com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com intervalo de confiança de 95%. Foi considerada diferença estatisticamente significativa o valor de $p < 0,05$.

O fato de pacientes infectados, com ou sem vacina, possuírem maior título de anticorpos anti-YFV ES-504 do que os controles vacinados e, portanto, maior do que os títulos contra a cepa YFV 17DD (Figura 24), sugere que eles foram gerados após o contato com o vírus selvagem e, portanto, é provável que tivessem maior afinidade e especificidade com a cepa selvagem. Um estudo de Haslwanter e colaboradores (112) mostrou que indivíduos vacinados possuem menor resposta contra cepas de YFV selvagens pois elas possuem mutações estruturais na proteína do envelope viral que escapam dos anticorpos gerados pela vacinação. Com isso, ao realizar o ensaio com a cepa selvagem, verificamos uma capacidade de ligação de anticorpos muito maior, o que culminou na sua maior detecção.

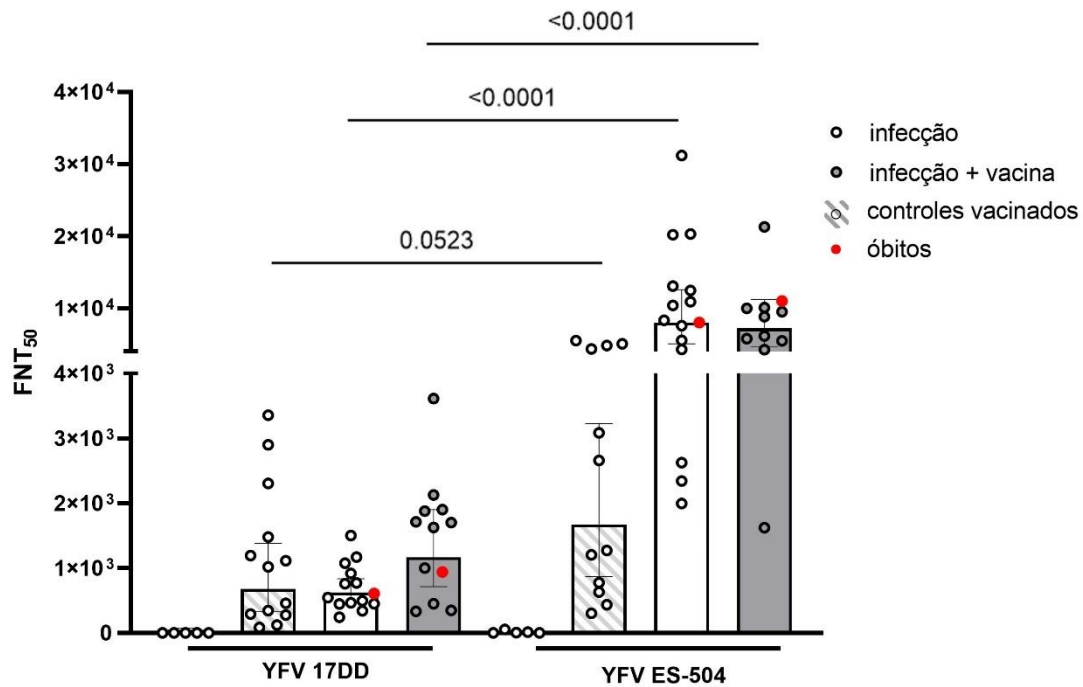


Figura 24. Comparação da resposta de anticorpos neutralizantes contra as cepas YFV 17DD e ES-504. O título de anticorpos neutralizantes no plasma foi calculado como FNT₅₀, ou seja, a quantidade de anticorpos suficiente para neutralizar 50% dos vírus no ensaio de neutralização por FACS (FNT, do inglês FACS-based neutralization assay), em uma curva de dose-resposta sigmoidal de 4 parâmetros. Os diferentes grupos estão destacados na gradação de cinza das barras e pontos (pré-vacinação, vacina, infecção e infecção + vacina, respectivamente), e os óbitos estão destacados em vermelho. Os resultados estão apresentados em média geométrica com intervalo de 95% de confiança. Para comparar os mesmos grupos entre as duas cepas diferentes foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, com intervalo de confiança de 95%. Foi considerada diferença estatisticamente significativa o valor de $p < 0,05$.

Ao mesmo tempo, como os anticorpos gerados pela vacina não se ligam tão bem na cepa selvagem, nesse tipo de ensaio amostras de indivíduos controles pós-vacinação costumam apresentar títulos muito baixos, como o apresentado no gráfico acima. Sendo assim, se o grupo IV realmente tivesse anticorpos contra a cepa 17DD, estes não seriam muito bem detectados neste tipo de ensaio, pois a detecção maior seria dos anticorpos contra a cepa selvagem. E de fato esse foi o observado, a diferença que existia antes entre os grupos INV e IV desapareceu, fortalecendo os indícios de que este último grupo realmente tenha desenvolvido anticorpos contra a vacina, mesmo em um intervalo curto de tempo em relação ao início dos sintomas e em meio à presença do vírus selvagem em circulação.

Por fim, em relação ao tempo decorrido da vacinação até o início dos sintomas, podemos ver que a maior parte dos indivíduos infectados que recebeu a vacina antes do início dos sintomas teve maior título de anticorpos tanto contra a cepa YFV 17DD (Figura 25A) quanto contra a cepa YFV ES-504 (Figura 25B), do que os que foram

imunizados em dias mais próximos ao início dos sintomas. Dos 14 indivíduos IV analisados, dois (14,3%) receberam a vacina há mais de 10 dias em relação à data reportada de início dos sintomas, data na qual a vacinação é recomendada pelo Ministério da Saúde por ser o intervalo adequado para a produção de anticorpos (53). Oito pacientes (57,1%) relataram vacinação de um a oito dias antes do início dos sintomas, dois (14,3%) foram vacinados no mesmo dia em que reportaram os primeiros sintomas e dois (14,3%) receberam vacinação após o início dos sintomas. Inclusive, os dois indivíduos que reportaram vacinação há 10 dias ou mais antes do início dos sintomas foram considerados *outliers* nos dois gráficos, devido ao elevado título de anticorpos obtido. Ainda que não pudessem ser representados no gráfico juntamente com os outros subgrupos, isso sugere a potência da vacinação em induzir altos títulos de anticorpos neutralizantes e a recomendação do Ministério da Saúde para que a vacinação ocorra pelo menos 10 dias antes de o indivíduo se expor a uma área com risco de contrair febre amarela (53). Além disso, é um indício de que a vacinação durante a infecção ativa não prejudica a resposta humoral dos indivíduos infectados.

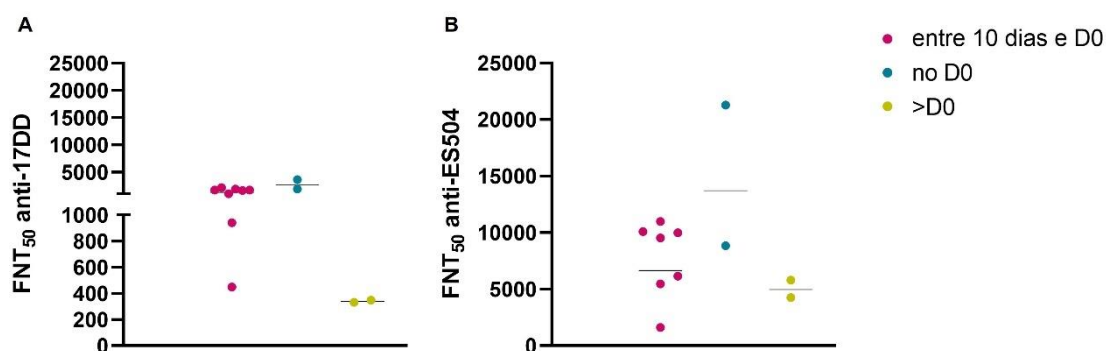


Figura 25. Comparação da resposta de anticorpos neutralizantes em indivíduos infectados/vacinados (IV) em diferentes tempos de vacinação, em relação à data de início dos sintomas. Todos os indivíduos IV foram avaliados com as cepas (A) YFV 17DD e (B) YFV ES-504, entre os dias 10 e 14 após o início dos sintomas, de acordo com a disponibilidade de amostras. As duas cepas foram comparadas e os outliers removidos. Entre 10 dias e D0: vacinação há menos de 10 dias do início dos sintomas (D0). No D0: vacinação no mesmo dia do início dos sintomas. >D0: vacinação após o início dos sintomas.

Em suma, como pudemos observar que o grupo IV possuía maior quantidade de anticorpos do que o grupo INV, e que esses anticorpos também são principalmente neutralizantes contra a cepa YFV 17DD (pois a diferença desaparece quando testamos as mesmas amostras contra a cepa selvagem YFV ES-504), o próximo passo foi investigar se seria possível detectar a cepa vacinal na circulação destes pacientes, e se a carga viral destes indivíduos poderia ser impactada pela vacinação concomitante à infecção.

4.3 Carga viral

Conforme descrito anteriormente, como os indivíduos IV foram imunizados com a formulação 17DD poucos dias antes dos sintomas, havia a possibilidade de que no momento da vacinação já houvesse carga viral do vírus selvagem. De acordo com Campi-Azevedo e colaboradores (135), a vacina YFV 17DD é capaz de gerar viremia, com pico em até cinco dias após a imunização, sendo detectável por até sete dias. Segundo os autores, esta cinética é verdadeira tanto para a dose inteira quanto para a dose fracionada do imunizante.

Assim, foi feita a pesquisa da viremia destes pacientes, primeiramente para verificar se seria possível a detecção de vírus vacinal e depois para verificar se a concentração de vírus ao longo do tempo sofreu alguma alteração. Esses dados foram obtidos para serem correlacionados com o desfecho da doença e com a resposta humoral dos pacientes. Além disso, a busca da cepa YFV 17DD em indivíduos que relataram vacinação e apresentaram sintomas clínicos auxilia no diagnóstico de doença viscerotrópica, reação adversa rara à vacinação.

Por meio de qPCR com *primers* específicos, foi observada a ausência da cepa vacinal nesses indivíduos, de maneira que foi excluída a possibilidade de doença viscerotrópica decorrente da vacina. Apesar da data de início dos sintomas condizer com os relatos de YEL-AVD, que tem início de um a oito dias pós-vacinação, a doença é caracterizada pela disseminação e replicação da cepa viral, fazendo com que ela seja detectada em casos positivos (141). Assim, como a qPCR foi negativa, pode-se afirmar que não se trata de doença viscerotrópica ou reação decorrente da vacina, mas sim de febre amarela selvagem.

Como a carga viral do vírus selvagem era muito alta, ela pode ter mascarado a detecção do vírus vacinal (86), ou a carga viral da cepa vacinal na dose fracionada pode ter sido baixa a ponto de não ser detectada. Outra hipótese é a ocorrência do fenômeno de interferência viral. De acordo com a literatura, algumas infecções virais podem momentaneamente inibir a replicação de outros vírus no caso de uma infecção simultânea, como já descrito para dengue (142), febre do oeste do Nilo e a própria febre amarela (86,143). Um estudo prévio mostrou que macacos infectados com duas cepas selvagens de febre amarela ficavam mais protegidos de desenvolver a doença do que os infectados com apenas uma cepa (86). Interessantemente, um estudo de 1945 mostrou que em culturas *in vitro* com o vírus 17DD, quando adicionado o vírus selvagem Asibi, este crescia menos e gerava menor mortalidade em camundongos (143).

Em relação à carga viral do YFV, não foi encontrada diferença entre as medianas dos grupos INV e IV, nos diferentes tempos coletados (Figura 26A). Quando separados

em sobreviventes (Figura 26B) e óbitos (Figura 26C), também não foi verificada diferença entre os grupos.

A carga viral dos óbitos é maior do que a dos sobreviventes, conforme publicado por Avelino-Silva e colaboradores (31), e está independentemente relacionada com o óbito. A presença de vacina, no entanto, não pôde ser associada a uma carga viral diferente nos pacientes. Além disso, não foi encontrada correlação dos anticorpos com o nível de carga viral, por dias de sintomas.

Em relação aos indivíduos IV, é importante ressaltar que o fato de estarem em menor número pode sugerir que indivíduos infectados e vacinados apresentem ausência de sintomas ou sintomas mais leves, fazendo com que menos pacientes procurem atendimento de saúde. Os indivíduos que relataram vacinação há aproximadamente 10 dias antes do início dos sintomas já não tiveram carga viral detectável logo na primeira coleta, que ocorreu entre seis e oito dias de sintomas nesses indivíduos, e todos os outros pacientes IV apresentaram carga viral zerada em até 14 dias após o início dos sintomas. Na Figura 27, pode-se observar que, com menos de 10 dias do início dos sintomas, o intervalo de vacinação não parece afetar a carga viral, mesmo com a imunização sendo aplicada após o início dos sintomas em alguns casos (pontos em amarelo). Estes inclusive apresentaram valores de carga viral ligeiramente menores, ainda que com o baixo número de indivíduos não seja possível realizar testes estatísticos.

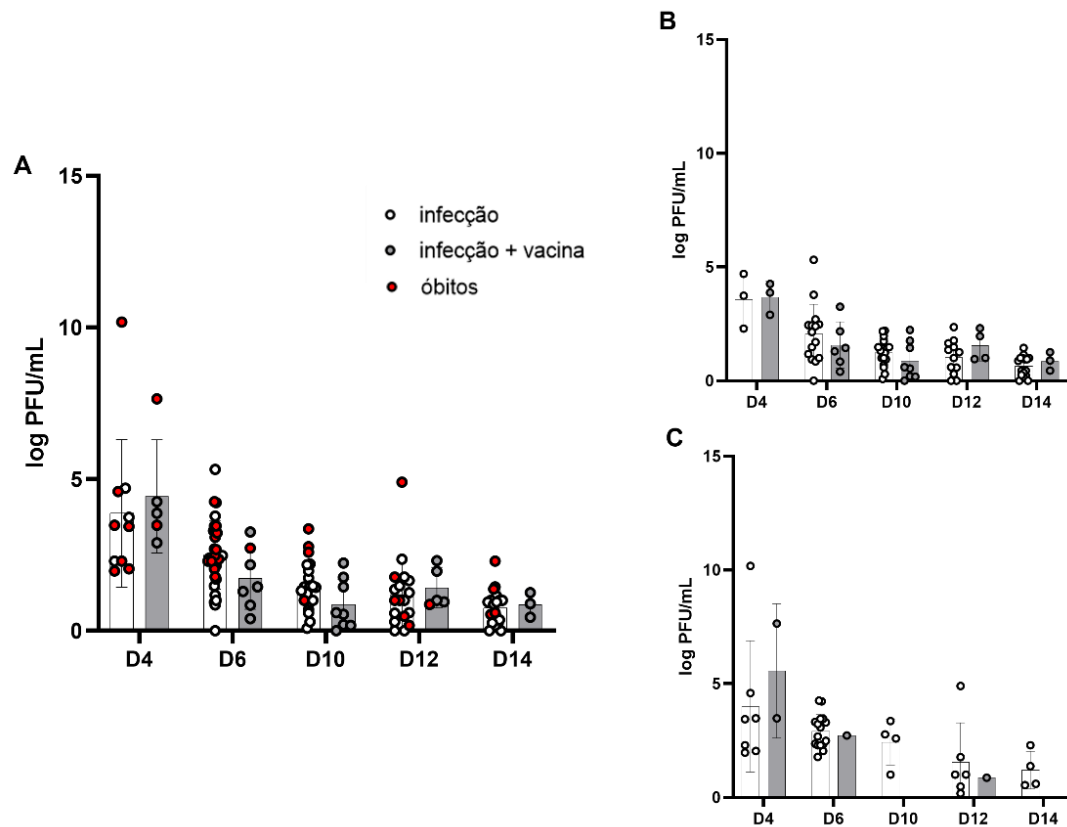


Figura 26. Carga viral estimada por qPCR dos indivíduos infectados pelo YFV. A carga viral em log PFU/mL foi quantificada para cada indivíduo em determinados pontos no tempo, a partir de 4 dias após o início dos sintomas (D4) até 14 dias (D14). (A) Indivíduos infectados não vacinados (INV, em branco) e infectados e vacinados (IV, em cinza) foram comparados entre si em cada tempo. Os óbitos de cada grupo estão destacados em vermelho. Os dois grupos foram então separados entre (B) sobreviventes e (C) óbitos para se comparar o efeito da vacina em cada grupo. O teste estatístico realizado foi Mann-Whitney, com $p < 0,05$ para significância. Sobreviventes: D4: INV $n = 3$, IV $n = 3$; D6: INV $n = 15$, IV $n = 6$; D10: INV $n = 17$, IV $n = 8$; D12: INV $n = 12$, IV $n = 4$; D14: INV $n = 16$, IV $n = 3$. Óbitos: D4: INV $n = 7$, IV $n = 2$; D6: INV $n = 16$, IV $n = 1$; D10: INV $n = 4$, IV $n = 0$; D12: INV $n = 6$, IV $n = 1$; D14: INV $n = 4$, IV $n = 0$. PFU: unidade formadora de placa.

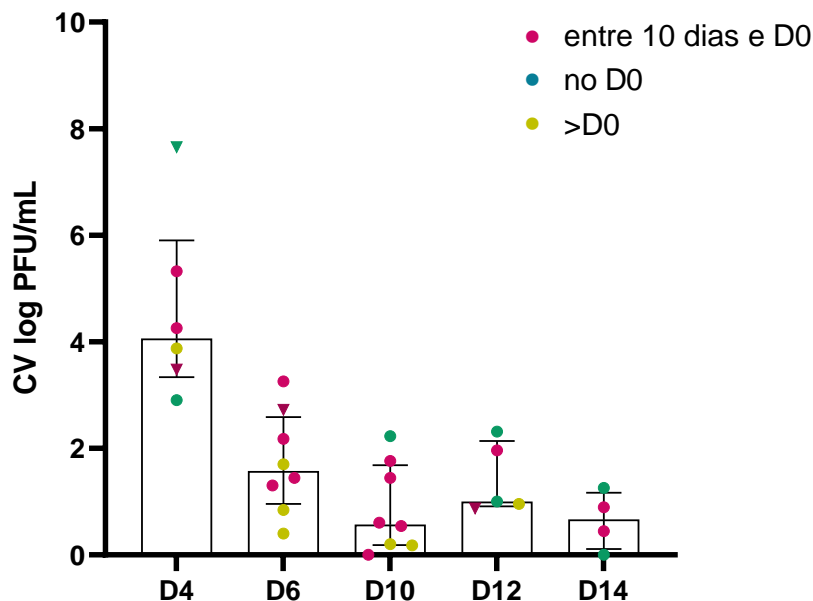


Figura 27. Representação da carga viral (CV) em log PFU/mL de indivíduos infectados com o vírus selvagem da febre amarela e vacinados com a formulação 17DD. As cores diferentes significam diferentes intervalos de tempo entre o recebimento do imunizante e o início dos sintomas, sendo o rosa a vacinação entre 10 dias e o início dos sintomas (D0), o verde a vacinação no mesmo dia do início dos sintomas e o amarelo a vacinação após o início dos sintomas. Os triângulos representam os indivíduos que foram a óbito. PFU: unidade formadora de placa.

Assim, com a diferença dos anticorpos neutralizantes encontrada no grupo IV em comparação aos pacientes INV, mas com a ausência de detecção da cepa YFV 17DD no plasma e ausência de diferença entre os grupos de pacientes avaliados, buscou-se sequenciar algumas amostras de pacientes IV, para verificar se a nível genômico seria possível encontrar o YFV 17DD. Por meio da metodologia de sequenciamento viral, mesmo com baixa carga viral vacinal, é possível avaliar se o vírus estava presente nas amostras ou se ele se integrou ao genoma do vírus selvagem, situação essa que impactaria na detecção da cepa vacinal pela qPCR, mas não na capacidade de ser detectado pelo sistema imune do hospedeiro a ponto de gerar anticorpos específicos.

4.4 Análise molecular e filogenética

Para a análise molecular e filogenética de sequências virais provenientes de indivíduos IV, com o objetivo de buscar traços da cepa vacinal YFV 1DD, foram utilizadas amostras de plasma de três indivíduos com infecção pelo YFV confirmada e com relato de vacinação anterior ao início dos sintomas. Na Tabela 6 estão apresentadas as datas de vacinação e de início de sintomas, bem como a data de coleta das amostras e a carga viral detectada.

Tabela 6. Informações referentes às amostras de plasma de pacientes infectados pelo YFV avaliadas pelo sequenciamento.

Indivíduo	Data de vacinação	Data de início dos sintomas	Intervalo entre vacinação e início dos sintomas (dias)	Data de coleta da amostra	Carga viral (\log_{10} PFU/mL)
1004	2018*	06/01/2018	≤ 6	11/01/2018	3,2
1019	10/01/2018	14/01/2018	4	16/01/2018	5,3
1105	14/01/2019	15/01/2019	1	18/01/2019	4,2

*Paciente informou que a vacinação havia ocorrido naquele ano, porém não se recorda da data exata.

Como o vírus YFV 17DD não foi encontrado pela qPCR, buscou-se, por meio do sequenciamento do genoma completo do vírus, a presença de fragmentos da cepa vacinal, soltos no plasma ou integrados ao genoma da cepa selvagem, para verificar se seria possível identificar a presença do YFV 17DD após a vacinação. Para isso, comparamos as sequências de *primers* utilizadas para diferenciar as cepas vacinal e selvagem publicadas por Fischer e colaboradores (126) tanto nas *reads* geradas quanto nos genomas finalizados, porém não foi encontrada correspondência com o vírus vacinal, sendo observada apenas correspondências com as sequências do vírus selvagem. Os cromatogramas correspondentes às regiões diferenciais também foram analisados, mas não foi identificada a presença de dois vírus diferentes, ou de recombinação.

A falta de identificação da cepa vacinal por PCR nas amostras coletadas dias após a vacinação pode indicar que o vírus não estava replicando, por isso não teve sua carga viral aumentada o suficiente para a detecção. Geralmente, uma dose completa da vacina contém aproximadamente $4,4 \pm 0,2 \log_{10}$ PFU (144), e considerando que os indivíduos receberam a dose fracionada conforme as campanhas de vacinação para a contenção do surto de febre amarela na época, essa quantidade pode ter sido cinco vezes menor. Quando comparamos com a elevada carga viral dos indivíduos analisados, na Tabela 6 acima, é possível que o vírus selvagem tenha se sobressaído em relação à cepa vacinal, impedindo sua detecção. Ainda, é possível que tenha ocorrido o fenômeno de interferência viral. Como os indivíduos começaram a apresentar sintomas poucos dias após a vacinação, isso significa que eles já estavam infectados com o vírus selvagem, uma vez que seu tempo de incubação varia entre 3 e 6 dias (30). Nesse caso, conforme proposto por Dianzani (85), o vírus selvagem pode ter interferido

na infecção e/ou replicação da cepa vacinal. Um possível mecanismo que pode gerar esse evento de interferência propõe que, uma vez que um vírus se ligue ao seu receptor específico para infectar a célula hospedeira, este mesmo receptor torna-se inapto para se ligar a outros vírus (85). Nesse caso, prevaleceria o primeiro vírus a infectar o hospedeiro. Outro possível mecanismo sugere que a infecção primária pode induzir a produção de IFN do tipo I e III pelas células infectadas, e essa ativação da resposta imune inata atuaria como uma imunidade não específica e temporária contra uma segunda infecção.

O próximo passo da análise, então, foi alinhar as novas sequências isoladas de indivíduos da nossa coorte (ARB1004, ARB1019 e ARB1105) com genomas de YFV selvagens e vacinais (Figura 28) e construir uma árvore filogenética (Figura 29), para verificar o seu agrupamento e proximidade.

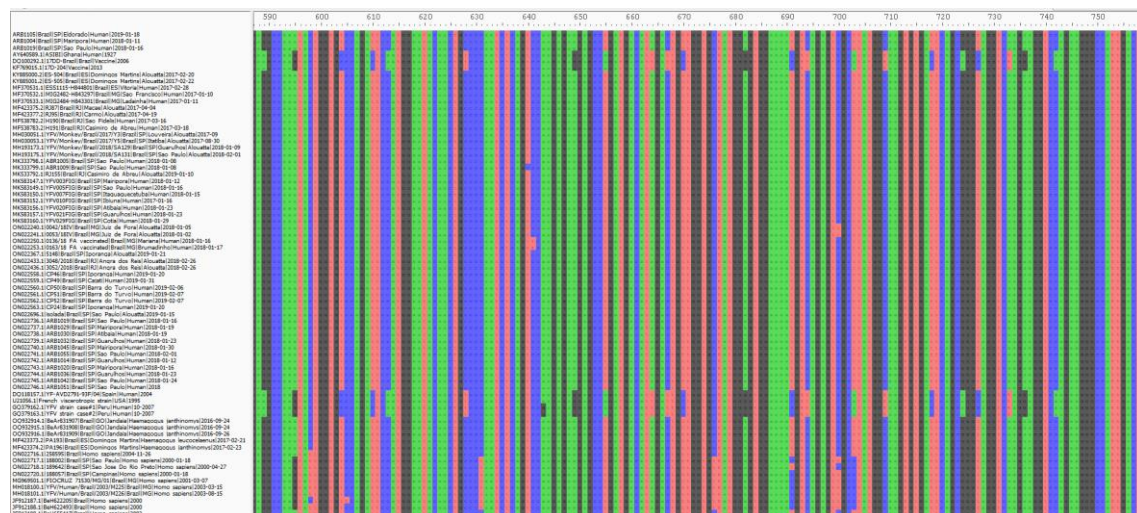


Figura 28. Captura de tela com exemplo de trecho de alinhamento múltiplo de sequências de YFV provenientes de diversas fontes públicas. As três primeiras sequências foram as geradas neste projeto. Visualização do programa AliView versão 1.28.

Na árvore filogenética, pode-se observar que as sequências isoladas formaram um clado com as sequências obtidas a partir do surto ocorrido no estado de São Paulo entre 2018 e 2019. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap*. Com esses valores de suporte dos ramos, é possível verificar o grau de confiabilidade da árvore filogenética, pois representam o número de vezes que os dados foram reamostrados e reanalisados e produziram os mesmos resultados (145).

As sequências de vírus isolados das formulações vacinais formaram outro clado, com a cepa ancestral Asibi, mostrando mais proximidade com ela do que com as cepas virais circulantes no Brasil em 2018. Com isso, e com a semelhança demonstrada das cepas ARB1004, ARB1019 e ARB1105 com as presentes no Brasil na época, exclui-se

a possibilidade de serem vírus provenientes da vacina ou de terem recombinado com a cepa 17DD. Além disso, a partir da comparação mais robusta com outras sequências e análise no programa *Genome Detective*, disponível online (www.genomedetective.com/app/typingtool/yellowfever/), as amostras sequenciadas nesse estudo foram classificadas como pertencentes ao genótipo *South American I*, assim como as cepas selvagens que foram isoladas de pacientes no Brasil desde 2017 (81,146,147)

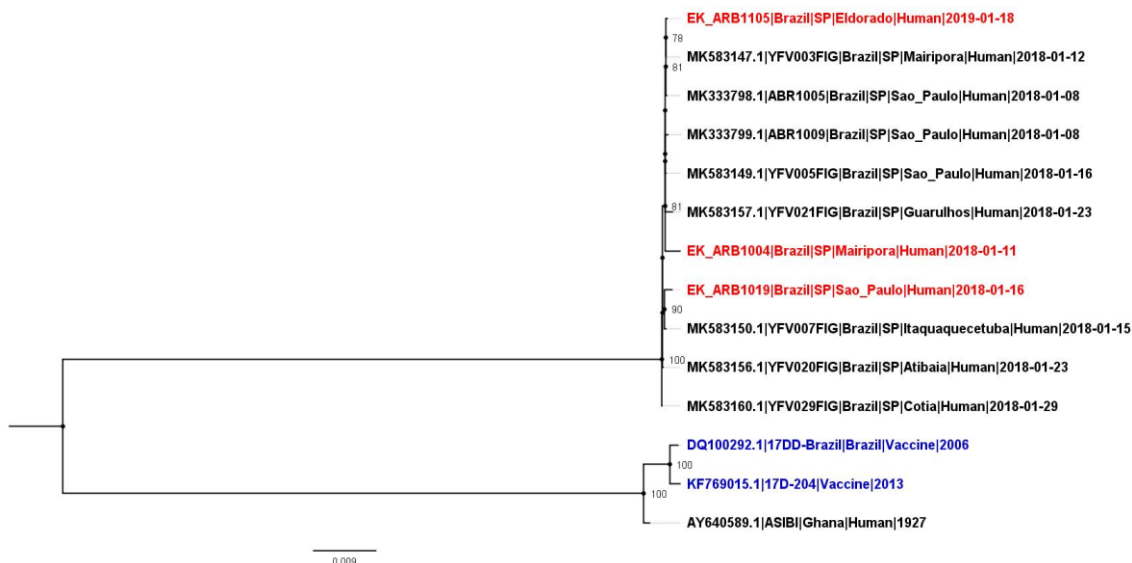


Figura 29. Árvore filogenética com sequências de YFV selvagens e vacinais. A árvore filogenética de máxima verossimilhança, enraizada no ponto médio, foi construída usando 11 sequências de genomas de YFV provenientes de plasma de indivíduos infectados em São Paulo em 2018, duas sequências de cepas vacinais (em azul) e a cepa ancestral Asibi. As sequências em vermelho representam as geradas neste estudo. Os números abaixo dos nós dos ramos indicam o suporte de *bootstrap*. O modelo de substituição para a inferência filogenética definido pelo IQTREE foi o TIM2+F, e a árvore foi enraizada no ponto médio.

Em seguida, foi construída outra árvore com as sequências isoladas de pacientes com febre amarela, mas com o acréscimo de sequências isoladas de pacientes com YEL-AVD confirmada e uma cepa vacinal francesa com essa característica, para verificar se haveria agrupamento com as sequências geradas neste trabalho. Também foram acrescentadas duas sequências públicas de pacientes com YFV confirmada e presença de vacinação, mas sem YEL-AVD (Figura 30). Nela, é possível ver que as sequências de YEL-AVD se agruparam com as cepas vacinais e ancestrais, ficando distantes das cepas selvagens da época do surto. Desse modo, foi possível verificar que as sequências obtidas dos pacientes IV são provenientes de vírus selvagem, não havendo mistura com vírus vacinal nem sendo característicos de quadros de doença viscerotrópica.

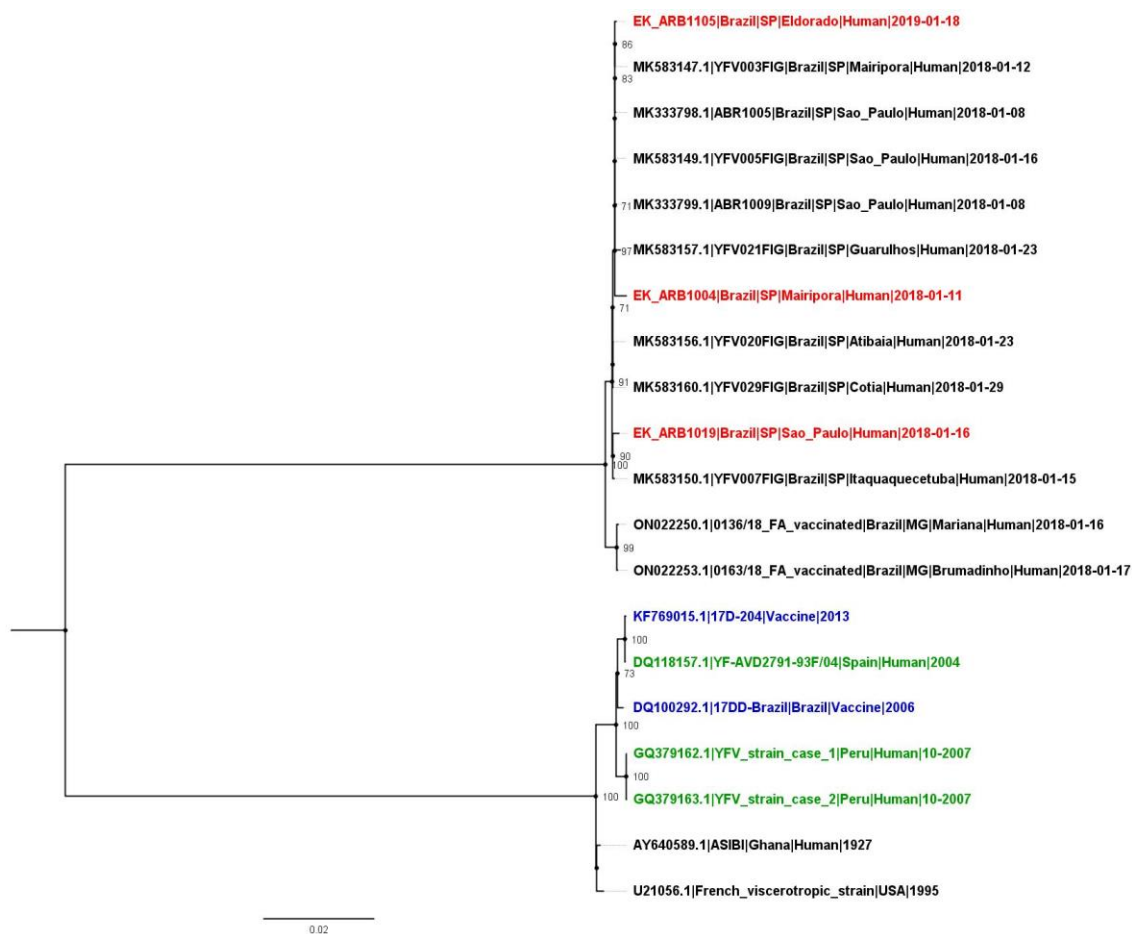


Figura 30. Árvore filogenética com sequências isoladas a partir de quadro de doença viscerotrópica. Árvore filogenética de máxima verossimilhança, enraizada no ponto médio, foi construída usando 13 sequências de genomas de YFV provenientes de plasma de indivíduos infectados em São Paulo e Minas Gerais em 2018, duas sequências de cepas vacinais (em azul), três sequências isoladas de pacientes diagnosticados com doença viscerotrópica (em verde), a cepa ancestral Asibi e a cepa francesa. As sequências em vermelho representam as geradas neste estudo. Os números abaixo dos nós dos ramos indicam o suporte de *bootstrap*. O modelo de substituição para a inferência filogenética definido pelo IQTREE foi o TIM2+F+G4, e a árvore foi enraizada no ponto médio.

Com isso, realizamos mais uma análise filogenética, agora com sequências de vírus isolados de seres humanos, PNH e mosquitos, geradas em diferentes anos e de diferentes estados brasileiros (Figura 31), para visualizar onde as nossas sequências se agrupam e com quais grupos elas possuem maior proximidade. A partir dela, é possível verificar que as nossas sequências (apontadas pelas setas em preto) ficaram agrupadas com outras, também isoladas no estado de São Paulo, entre 2017 e 2019, tanto em seres humanos como em PNH do gênero *Alouatta* sp. Esses dados condizem com um estudo recente publicado por Giovanetti e colaboradores (147) no qual os pesquisadores verificaram que os vírus isolados na região sudeste do país formaram

um clado separado dos vírus circulantes na região norte, e estes tiveram grande dispersão nos estados do Sudeste, tanto em seres humanos quanto em PNH hospedeiros.

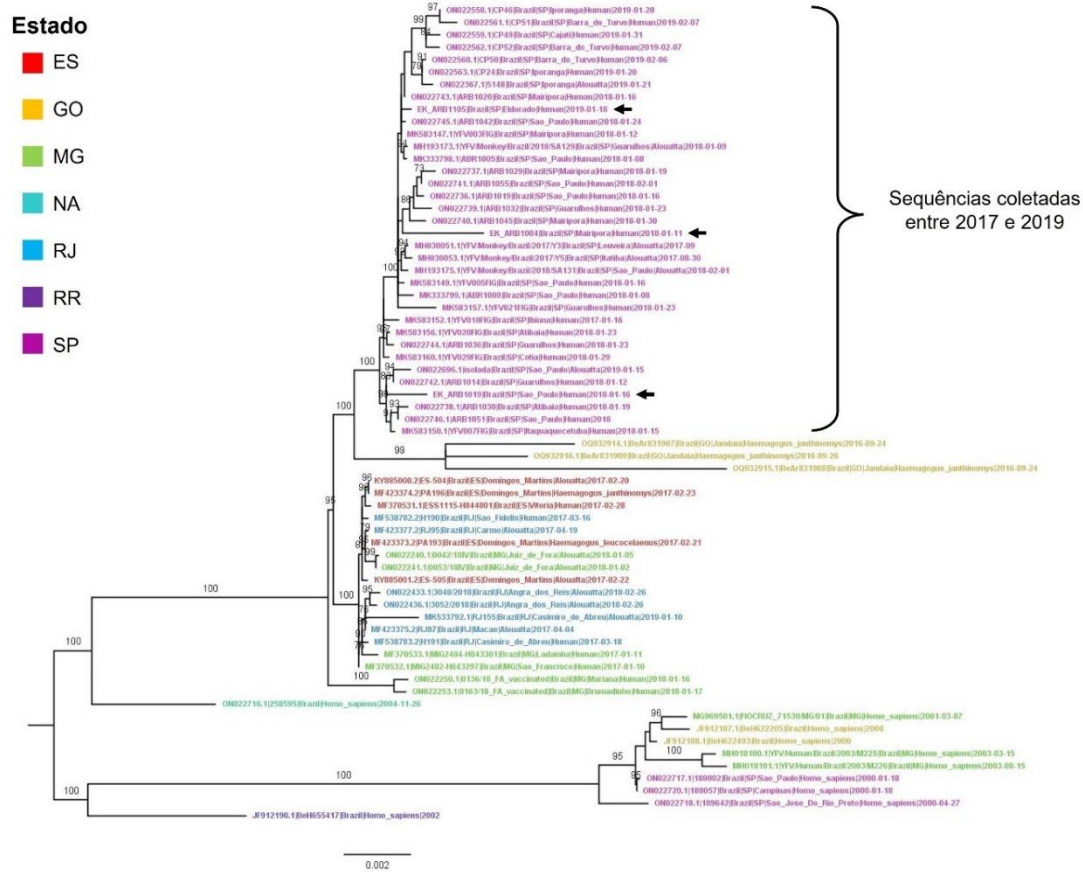


Figura 31. Árvore filogenética com sequências de YFV provenientes de diferentes regiões do país. A árvore de máxima verossimilhança, enraizada no ponto médio, foi construída usando sequências de genomas de YFV provenientes de diversos hospedeiros e de diversos estados do Brasil, ao longo dos anos. As cores indicam os estados nos quais as sequências foram identificadas e isoladas. As setas em preto identificam as sequências isoladas neste estudo. Os números abaixo dos nós dos ramos indicam o suporte de *bootstrap*. O modelo de substituição para a inferência filogenética definido pelo IQTREE foi o TN+F+R3, e a árvore foi enraizada no ponto médio.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A febre amarela é uma doença grave e sem tratamentos específicos aprovados até o momento (49), mas que conta com uma vacina desenvolvida na década de 30 que é ainda utilizada e possui uma das maiores eficácias já registradas em uma formulação vacinal (48). Em estados da região sudeste, o Ministério da Saúde recomendava que a vacina YFV 17DD fosse administrada a indivíduos que iriam se expor a uma área de risco de contrair a doença, dez dias antes da exposição (53). Entretanto, desde o surto de 2017-2019 no sudeste do Brasil, a vacinação passou a ser recomendada para todo o território nacional (148). O intervalo de tempo mínimo da vacinação é recomendado por conta dos estudos de eficácia da vacina, que mostraram altos títulos de anticorpos neutralizantes nos indivíduos imunizados após esse período (1). Desse modo, pode haver bloqueio da infecção, e então o vírus não se multiplica no indivíduo, não havendo geração de sintomas, podendo ser considerado protegido contra a infecção pelo YFV por toda a vida (54).

Durante o surto recente ocorrido no país, no entanto, quando a febre amarela foi detectada em PNH e começou a se espalhar em seres humanos, governos locais iniciaram campanhas de vacinação em massa para tentar conter o avanço de vírus, entretanto a população já se encontrava exposta ao YFV, não havendo tempo hábil para vacinar a todos em um intervalo de tempo que impedisse a infecção. Isso fez com que os estados do sudeste registrassem um número elevado de casos da doença, que culminou na publicação de diversos artigos descrevendo a doença selvagem e fatores clínicos e laboratoriais que foram importantes para o cuidado desses pacientes (36,113,114).

No entanto, chamou a atenção o fato de que, por conta das campanhas de vacinação terem sido realizadas em locais nos quais o vírus estava em circulação, foram atendidos nos hospitais indivíduos com quadro confirmado de febre amarela, mas que relataram vacinação recente, alguns dias antes ou até mesmo dias depois de os sintomas característicos da febre amarela começarem a se manifestar. Como a vacina utilizada é composta pelo vírus vivo atenuado da febre amarela, isso sugere que nesses indivíduos o vírus selvagem e o vírus vacinal estavam circulando ao mesmo tempo, levantando diversos questionamentos sobre o que poderia ocorrer na resposta imune destes pacientes, bem como quais seriam os impactos no prognóstico a doença e na diversidade viral.

Essa situação, embora ainda não descrita na literatura para a febre amarela, foi muito documentada durante a pandemia de COVID-19 (149) e é muito comum em casos de Influenza (89). No caso da COVID-19, como o vírus estava em circulação quando as

primeiras vacinas começaram a ser aplicadas, era usual encontrar relatos de indivíduos que receberam a vacina e começaram a desenvolver sintomas dias depois, descobrindo então que estavam infectados com a cepa selvagem, muito por conta da suscetibilidade individual e da menor eficácia de algumas formulações vacinais (150). Nesses casos, a maior parte das vacinas era composta por mRNA viral ou vetores virais, não impedindo a infecção pelo vírus selvagem e não interagindo com ele, mas essa situação se mostrou capaz de diminuir a gravidade dos sintomas (151). Em relação ao Influenza, o vírus possui uma característica chamada *antigenic shift*, com o qual é capaz de trocar genes de hemaglutinina ou neuraminidase com outro vírus que esteja coinfetando a mesma célula, levando à geração de novas cepas virais (89). Como os vírus selvagem e vacinal da febre amarela são muito semelhantes (50), a presença de ambos no organismo do mesmo indivíduo levantou a dúvida se eles seriam capazes de trocar genes entre si também, gerando cepas modificadas e alterando assim a resposta imune do hospedeiro.

Neste estudo, tivemos o objetivo de avaliar a resposta humoral de indivíduos infectados e vacinados, e verificar se a infecção selvagem em coexistência com o vírus vacinal poderia alterar as características e a magnitude da resposta humoral, pois esta é o principal correlato de proteção da vacina (138), e dessa maneira levar o indivíduo a desenvolver um quadro mais leve doença. Além disso, também avaliamos se as duas cepas interagiram entre si, modificando a carga viral dos pacientes e dando origem a novas cepas com a combinação dos genomas dos dois vírus. Os resultados encontrados foram surpreendentes, uma vez que a vacinação mostrou que, mesmo sendo administrada com poucos dias de diferença do início dos sintomas, foi capaz de gerar anticorpos específicos contra o YFV 17DD, que se somaram aos anticorpos contra a cepa selvagem e resultaram em maior título no grupo IV, em comparação ao grupo de pacientes INV. Isso sugere que não só a vacina é capaz de induzir uma resposta neutralizante específica em pouco tempo, mas também que ela não interfere ou prejudica na resposta do vírus selvagem. E como as cepas sequenciadas foram muito semelhantes às cepas selvagens, sem traços da cepa vacinal, isso sugere que as duas cepas não interagiram entre si no organismo, mas estimulam o sistema imune independentemente. Além disso, como a maioria dos indivíduos vacinados recebeu a dose fracionada da vacina, por conta das campanhas de vacinação de emergência, isso mostra que doses menores da vacina ainda são capazes de induzir uma potente resposta humoral.

Ainda, o grupo IV teve taxa de letalidade muito menor do que o grupo sem vacina. Ambos os grupos desenvolveram sintomas e estavam hospitalizados, porém um menor número de indivíduos vacinados que buscaram atendimento hospitalar pode ser um indicativo de proteção da vacina e, juntamente com a menor incidência de óbitos nesse

grupo, sugere que a vacinação recente pode ter contribuído para a menor gravidade da doença e melhor desfecho clínico.

Quanto à carga viral, a vacinação não mostrou aumentar a quantidade de vírus detectado nos ensaios. Isso pode ter sido devido ao fato da vacina fracionada ter uma quantidade menor de vírus atenuados, o que fez com que eles não pudessem ser identificados nos ensaios. Ainda assim, é interessante o fato de que o vírus YFV 17DD não foi identificado em nenhum dos dois ensaios, tanto de carga viral quanto no sequenciamento, mas foi capaz de induzir a geração de anticorpos neutralizantes específicos para o YFV 17DD, reafirmando a eficácia vacinal.

Assim, os dados desse trabalho sugerem que a vacinação contra a febre amarela pode ser uma estratégia não só de prevenção da doença, mas também de redução de mortalidade em casos de surtos, pois a vacinação em estágios recentes da infecção é capaz de induzir anticorpos neutralizantes que reforçam o sistema imune do hospedeiro, contribuindo para o melhor controle da doença no futuro.



6. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos propostos para este estudo, conclui-se que:

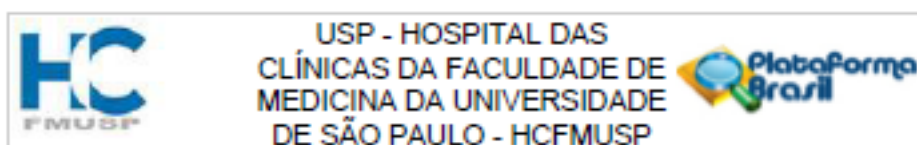
- Indivíduos infectados pelo vírus da febre amarela, vacinados ou não vacinados, não tiveram diferenças quanto à quantidade de anticorpos IgM e IgG totais circulantes;
- Indivíduos infectados pelo YFV e vacinados com a formulação YFV 17DD produziram maiores títulos de anticorpos neutralizantes contra a cepa vacinal do que indivíduos infectados sem vacinação;
- O vírus vacinal não foi identificado nos indivíduos vacinados, tanto pela PCR quanto pelo método de sequenciamento;
- Os vírus isolados de pacientes infectados e vacinados foram caracterizados como selvagens, pertencentes ao genótipo *South America I*, semelhantes a outros vírus selvagens circulantes na época do surto;
- O uso da vacinação em estágios recentes de infecção sugere diminuir a mortalidade de pacientes diagnosticados com febre amarela, aumentando o nível de anticorpos específicos e diminuindo a gravidade dos sintomas.

ANEXOS

ANEXO A. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

	USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Avaliação do impacto da resposta humoral induzida pela vacina anti-amarela atenuada 17DD administrada contiguamente ao início da infecção pelo vírus selvagem da febre amarela e sua influência na evolução clínica da doença		
Pesquisador: Esper Georges Kallás		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 47380321.7.0000.0068		
Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 4.802.012		
Apresentação do Projeto:		
As informações constantes nos itens apresentação do projeto, e objetivos foram retiradas dos seguintes arquivos: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1735444 e Projeto.pdf.		
Serão utilizadas 86 amostras criopreservadas de plasma de indivíduos recrutados para projetos previamente desenvolvidos no Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia, do Laboratório de Investigação Médica (LIM) 60, aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e com Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinados. No ensaio de neutralização foram utilizadas amostras de pacientes com infecção por YFV acompanhados previamente pelo Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) e pelo HCFMUSP. As amostras foram coletadas entre janeiro de 2018 e abril de 2019 e pertencem ao projeto "Arboviroses no contexto da imunotativação crônica pelo vírus da imunodeficiência humana" (CAPPesq: 15477 CAAE: 59542216.3.1001.0068). A coorte coletada no ano de 2018 foi previamente publicada em trabalhos de Kallás e colaboradores e Ho e colaboradores. Todos os pacientes tinham 18 anos ou mais e, após o aceite do TCLE, foram incluídos caso possuissem histórico de viagem a áreas geográficas com casos confirmados de febre amarela. A infecção pelo YFV nos casos da coorte foi confirmada pela detecção do RNA viral no sangue ou em tecidos no momento da autópsia quando óbito, por meio de qPCR. Os pacientes admitidos no estudo eram negativos para HIV e não		
Endereço: Rua Ovídio Pinheiro Campos, 225 5º andar Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010 UF: SP Município: SAO PAULO Telefone: (11)2561-7585 Fax: (11)2561-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br		

Continuação



Continuação do Parecer: 4.800.012

apresentavam outras comorbidades. Eles foram acompanhados do momento da entrada no hospital até o óbito ou até 60 dias após a inclusão no estudo. Como grupo controle, foi utilizada uma coorte de 14 indivíduos saudáveis, que não possuíam histórico de infecção prévia por YFV ou vacinação e receberam uma dose da formulação YFV 17DD, previamente coletadas como controles para o projeto "Avaliação da segurança e imunogenicidade de diferentes doses da vacina contra Febre Amarela 17DD em populações especiais" (CAPPesq: 0206/10; CAAE: 83631318.000.068). As amostras foram coletadas 28 dias após a vacinação. Foram selecionadas amostras de plasma de pacientes infectados com intervalo entre 10 e 14 dias após o início dos sintomas, período no qual já houve produção de anticorpos. Eles foram divididos em indivíduos infectados com ou sem histórico de vacinação contra a febre amarela, pareados por idade, sexo e data de início dos sintomas. O mesmo pareamento foi realizado com os voluntários vacinados. Na admissão dos pacientes e voluntários nos estudos, foi coletado sangue periférico em tubos Vacutainer® contendo ACD (ácido citrico, citrato de sódio e dextrose, BD) e as amostras foram processadas no LIM-60. O plasma foi separado da porção celular do sangue total por duas centrifugações. Na primeira, os tubos de ACD foram centrifugados diretamente a 1800 rpm por 10 minutos, e o plasma coletado em tubos de 15 mL. Depois, estes tubos foram novamente centrifugados a 2800 rpm por 10 min, para a separação de debris celulares, e o sobrenadante foi aliquotado em criotubos de 1 mL e armazenado em freezer a -80°C para uso posterior. Para utilização nos ensaios de neutralização, as aliquotas necessárias de plasma foram descongeladas no dia do ensaio e incubadas em banho-maria a 56°C, por 30 minutos, para inativação de proteínas do sistema complemento.

Objetivo da Pesquisa:

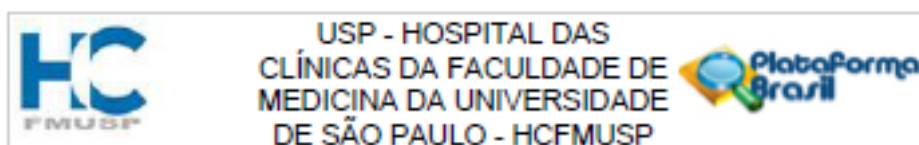
Objetivo Primário: O objetivo geral do presente trabalho é investigar o papel da vacinação com YFV 17DD na evolução clínica da infecção com o vírus selvagem da febre amarela. Para isso, os objetivos específicos serão: – pesquisar a presença de anticorpos neutralizantes no plasma de pacientes com ou sem vacinação, em ensaios *in vitro* com os vírus vacinal e selvagem da febre amarela, para correlacionar sua presença ou ausência com níveis de proteção; – verificar se há diferença entre os títulos gerados em ensaio com vírus vacinal ou selvagem; – avaliar dados laboratoriais e clínicos e correlacionar com a evolução da doença e com títulos de anticorpos neutralizantes; – comparar os títulos de anticorpos neutralizantes dos pacientes infectados com febre amarela com títulos de anticorpos de indivíduos vacinados com uma dose da vacina YFV

Endereço: Rua Ovídio Pinheiro de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)2561-7585 Fax: (11)2561-7585 E-mail: cappeladm@hc.fm.usp.br

Página 02 de 05

Continua na próxima página

Continuação



Continuação do Parecer: 4.802.012

17DD, sem histórico de infecção prévia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos para os participantes são mínimos, e são decorrentes de uma eventual quebra de confidencialidade. Também não há benefícios diretos para os participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo que utilizará 86 amostras de sangue estocadas em biorepositório e que foram coletadas para outros projetos em pacientes com a febre amarela. Também serão usadas 14 amostras de participantes vacinados e sem doença.

Os pesquisadores solicitam dispensa de novo TCLE e estamos de acordo, uma vez que já havia esta possibilidade nos TCLE dos projetos originais, desde que as pesquisas fossem autorizadas pela Comissão de Ética em Pesquisa. Também é importante ressaltar que a letalidade da febre amarela em participantes hospitalizados é elevada e muitos deles podem ter falecido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores incluíram entre os termos de apresentação obrigatória: 1. a folha de rosto preenchida e assinada corretamente; 2. Projeto completo; 3. Regulamento do biorepositório; 4. Solicitação de dispensa de novo TCLE; 5. Cronograma; 6. Orçamento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo de estudo atende as normas de ética em pesquisa vigentes no país e não há impedimentos éticos para a sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

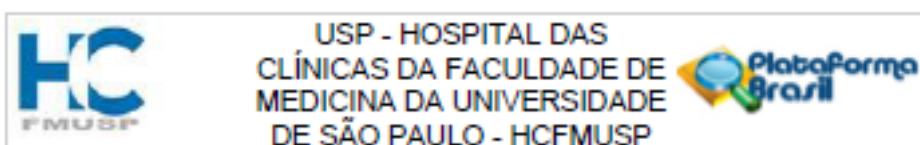
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar			
Bairro: Cerqueira César		CEP: 05.403-010	
UF: SP	Município: SÃO PAULO		
Telefone: (11)2561-7585	Fax: (11)2561-7585	E-mail: ceppeq adm@hc.fm.usp.br	

Página 03 de 05

Continua na próxima página

Continuação



Continuação do Parecer: 4.802.012

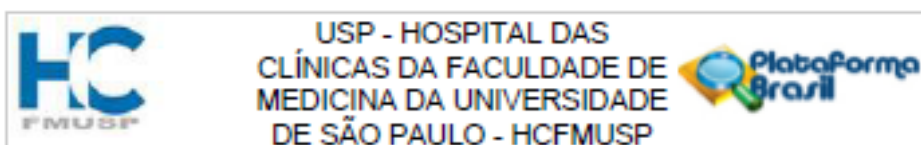
Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1735444.pdf	27/05/2021 17:45:54		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	27/05/2021 17:45:30	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	27/05/2021 17:44:32	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Outros	Uso_dos_dados.pdf	07/05/2021 12:28:14	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso.pdf	07/05/2021 12:28:54	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Outros	Termo_de_autorizacao.pdf	07/05/2021 12:27:52	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Outros	Submissao_CAPPEEQ.pdf	07/05/2021 12:26:41	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Outros	Resumo_do_projeto.pdf	07/05/2021 12:26:18	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Outros	Justificativa_sem_custo.pdf	07/05/2021 12:26:45	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Outros	Justificativa_de_utilizacao_das_amostras.pdf	07/05/2021 12:25:28	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Outros	Justificativa_da_solicitacao_de_dispensa_TCLE.pdf	07/05/2021 12:24:57	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Outros	Declaracao_de_compromisso_de_doutorado.pdf	07/05/2021 12:23:40	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Outros	Aprovacao_do_pais_de_origem.pdf	07/05/2021 12:23:09	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Orçamento	Orçamento_detalhado_da_pesquisa.pdf	07/05/2021 12:22:37	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_compromisso_com_o_delineamento_do_estudo.pdf	07/05/2021 12:22:08	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio_e_regulamento_de_funcionamento.pdf	07/05/2021 12:21:49	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio.pdf	07/05/2021 12:21:36	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_infraestrutura.pdf	07/05/2021 12:21:15	Carolina Argondizo Correlá	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_execucao.pdf	07/05/2021	Carolina Argondizo	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappeeq.adm@hc.fm.usp.br

Página 04 de 05

Continua na próxima página

Continuação



Continuação do Parecer: 4.800.012

Cronograma	Cronograma_de_execucao.pdf	12:21:00	Correia	Acelto
------------	----------------------------	----------	---------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Neecessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 24 de Junho de 2021

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2561-7585 Fax: (11)2561-7585 E-mail: ceppeq adm@hc.fm.usp.br

REFERÊNCIAS

1. Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: Innate immunity to systems vaccinology. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(10):741–7.
2. Bryant JE, Holmes EC, Barrett ADT. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog.* 2007 May 18;3(5):e75.
3. Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 2010;87(2):125–48.
4. Cathey JT, Marr JS. Yellow fever, Asia and the East African slave trade. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014;108(5):252–7.
5. Murphy J. *An American Plague: The True and Terrifying Story of the Yellow Fever Epidemic of 1793.* Clarion Books. Clarion Books; 2003. 0–176 p.
6. Tomori O. Yellow fever in Africa: public health impact and prospects for control in the 21st century. *Biomedica.* 2002;22(2):178–210.
7. Jeffs C. Mosquitoes and the Panama Canal [Internet]. Vol. 2023. 2023. Available from: <https://www.insectweek.co.uk/news/mosquitoes-and-panama-canal>
8. Prabhu M. Yellow Fever and the Panama Canal [Internet]. Vol. 2023. 2021. Available from: <https://www.gavi.org/vaccineswork/yellow-fever-and-panama-canal>
9. Ahmed QA, Memish ZA. Yellow fever from Angola and Congo: a storm gathers. *Trop Doct.* 2017;47(2):92–6.
10. Carlos J Finlay. The Mosquito Hypothetically Considered as the Transmitting Agent of Yellow Fever. *MEDICC Rev.* 2012;14(1).
11. Walsh M. Yellow Fever. 2011;2023(13/01/2023).
12. Barrett ADT, Higgs S. Yellow fever: A disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol.* 2007;52(1):209–29.
13. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Boletim Epidemiológico Febre Amarela - 04/02/2019 [Internet]. 2019 [cited 2023 Oct 25]. Available from: https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/2019/fa19_boletim_epid_0402.pdf
14. Ministério da Saúde, Brasil. Guia de vigilância em saúde. 2021.

15. Possas C, Lourenço-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro F de P, Pissinatti A, Cunha RV da, et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(10):e180278.
16. Franco O. História da Febre Amarela no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1969.
17. Freed Eric, Martin M. *Fields Virology*. Fields Virology. 2013. 453–490 p.
18. Organization WH. Yellow fever [Internet]. Vol. 2022. 2019. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>
19. World Health Organization. Yellow Fever Initiative - Providing an opportunity of a lifetime [Internet]. 2010 [cited 2018 Jul 30]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/196433/WHO_HSE_GAR_ERI_2010.3_eng.pdf?sequence=1
20. Gaythorpe KAM, Hamlet ATP, Jean K, Ramos DG, Cibrelus L, Garske T, et al. The global burden of yellow fever. *medRxiv*. 2020;1–22.
21. Lacerda AB, del Castillo Saad L, Ikefuti PV, Pinter A, Chiaravalloti-Neto F. Diffusion of sylvatic yellow fever in the state of São Paulo, Brazil. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–11.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Febre Amarela no Brasil. 2020;51:1–19. Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/15/Boletim-epidemiologico-SVS-01.pdf>
23. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde - volume 1 [Internet]. 1st ed. Vol. 1. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. Available from: http://www.hc.ufu.br/sites/default/files/tmp//volume_1_guia_de_vigilancia_em_saude_2017.pdf
24. Ministério da Saúde, Brasil. Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela Brasil 2017/2018 Informe Nº 18 [Internet]. Ministério da Saúde. 2018. Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/informe-FA-n.3-21jan19.pdf>
25. Sacchetto L, Drumond BP, Han BA, Nogueira ML, Vasilakis N. Re-emergence of yellow fever in the neotropics - Quo vadis? *Emerg Top Life Sci*. 2020;4(4):411–22.
26. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Boletim Epidemiológico da Febre Amarela - 18/11/2019 [Internet]. 2019 [cited 2023 Oct 25]. Available from: <https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia->

- epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/2019/fa19_boletim_epid_1811.pdf
27. Valentine MJ, Murdock CC, Kelly PJ. Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. *Parasit Vectors*. 2019;12(1):1–18.
 28. Fioravanti C. O alarme dos macacos. *Pesquisa Fapesp* [Internet]. 2018;(263):18–23. Available from: <https://revistapesquisa.fapesp.br/o-alar-me-dos-macacos/>
 29. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde B. Situação epidemiológica da febre amarela - Monitoramento 2020/2021 [Internet]. Vol. 52, *Boletim Epidemiológico*. 2021. Available from: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/11/boletim_epidemiologico_svs_4.pdf
 30. Monath TP, Barrett ADT. Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever. *Adv Virus Res*. 2003;60(January):343–95.
 31. Avelino-Silva VI, of Infectious D, Parasitic Diseases Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo SPSP 05403 000 B, Thomazella MV, Medical Investigation Laboratory 60 (LIM-60) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo SPSP 1246 903 B, Marmorato MP, et al. Viral Kinetics in Sylvatic Yellow Fever Cases. *J Infect Dis*. 2022;(jiac435).
 32. Quaresma JAS, Pagliari C, Medeiros DBA, Duarte MIS, Vasconcelos PFC. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: Progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. Vol. 23, *Reviews in Medical Virology*. 2013. p. 305–18.
 33. Monath TP. Treatment of yellow fever. *Antiviral Res*. 2008;78(1):116–24.
 34. Domingo C, Charrel RN, Schmidt-Chanasit J, Zeller H, Reusken C. Yellow fever in the diagnostics laboratory. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1):1–15.
 35. Servadio JL, Muñoz-Zanzi C, Convertino M. Estimating case fatality risk of severe Yellow Fever cases: systematic literature review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):1–12.
 36. Kallas EG, D’Elia Zanella LGFAB, Moreira CH V., Buccheri R, Diniz GBF, Castiñeiras ACP, et al. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2019 Jul 1;19(7):750–8.
 37. Pan American Health Organization, World Health Organization. Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus infection. Pan American Health Organization and World Health Organization. 2018;(September):1–8.
 38. Dr. Lafuente’s Method of Curing Yellow Fever. *Med Phys J*. 1805 Dec;14(82):531–4.
 39. Clark J. A Treatise on the Yellow Fever, as It Appeared in the Island of Dominica, in the Years 1793-1796. *Ann Med*. 1797;155–83.

40. Julander JG. Experimental therapies for yellow fever. *Antiviral Res.* 2013 Feb;97(2):169–79.
41. de Freitas CS, Higa LM, Sacramento CQ, Ferreira AC, Reis PA, Delvecchio R, et al. Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(1).
42. Figueiredo-Mello C, Casadio LVB, Avelino-Silva VI, Yeh-Li H, Sztajn bok J, Joelsons D, et al. Efficacy of sofosbuvir as treatment for yellow fever: protocol for a randomised controlled trial in Brazil (SOFFA study). *BMJ Open.* 2019 Nov 1;9(11).
43. Fioravanti C. Cleaning the blood to treat yellow fever. 2019 [cited 2022 Dec 11]; Available from: <https://revistapesquisa.fapesp.br/en/cleaning-the-blood-to-treat-yellow-fever/>
44. Low JG, Ng JHJ, Ong EZ, Kalimuddin S, Wijaya L, Chan YFZ, et al. Phase 1 Trial of a Therapeutic Anti–Yellow Fever Virus Human Antibody. *New England Journal of Medicine.* 2020;383(5):452–9.
45. Sun H, Chen Q, Lai H. Development of antibody therapeutics against flaviviruses. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1).
46. TC P, DH F, RJ K, MS D. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. *Cell Host Microbe.* 2008;4(3).
47. Plotkin SA, Plotkin SL. The development of vaccines: how the past led to the future [Internet]. Nature Publishing Group. 2011 [cited 2020 Sep 11]. Available from: www.nature.com/reviews/micro
48. Monath TP. Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 2005;4(4):553–74.
49. Monath TP. Yellow fever: An update. *Lancet Infectious Diseases.* 2001;1(1):11–20.
50. da Silva M da PC, Bertani GR, Gonzales Gil LHV, Magalhães MCF, Cordeiro MT, Marques ETA, et al. Description of a Prospective 17DD Yellow Fever Vaccine Cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Oct 1;85(4):739–47.
51. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine.* 2012;30(29):4301–6.
52. Ministério da Saúde. Calendário Nacional de Vacinação 2017. 2017.
53. Ministério da Saúde, Brasil. Calendário Nacional de Vacinação [Internet]. Vol. 2023. Ministério da Saúde; 2023. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao/calendario-nacional-de-vacinacao>

54. Organização Mundial da Saúde. Vaccines and vaccination against yellow fever WHO Position Paper – June 2013 [Internet]. 2013. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer8827>
55. RW W, EF J, EM van L, EB R, IJ TB, AW de V, 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* [Internet]. 2016;11(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977808>
56. Gotuzzo E, Yactayo S, Córdova E. Review article: Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: Systematic review on the need for a booster every 10 years. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;89(3):434–44.
57. Niedrig M, Lademann M, Emmerich P, Lafrenz M. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: Neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Tropical Medicine and International Health*. 1999;4(12):867–71.
58. JD P, CH C, TP M, WG D, K M. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ*. 1981;59(6).
59. Bovay A, Nassiri S, Maby–El Hajjami H, Marcos Mondéjar P, Akondy RS, Ahmed R, et al. Minimal immune response to booster vaccination against Yellow Fever associated with pre-existing antibodies. *Vaccine* [Internet]. 2020;38(9):2172–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.01.045>
60. Ministério da Saúde, Brasil. Campanha de vacinação terá dose fracionada de febre amarela em três estados [Internet]. 2018 [cited 2020 Sep 17]. Available from: <https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42289-campanha-de-vacinacao-tera-dose-fracionada-de-febre-amarela-em-tres-estados>
61. Casey RM, Harris JB, Ahuka-Mundeke S, Dixon MG, Kizito GM, Nsele PM, et al. Immunogenicity of Fractional-Dose Vaccine during a Yellow Fever Outbreak — Final Report. <https://doi.org/101056/NEJMoa1710430>. 2019;
62. World Health Organization. Yellow fever vaccine: WHO position on the use of fractional doses – June 2017. Vol. 92, *Releve epidemiologique hebdomadaire*. 2017.
63. Juan-Giner A, Kimathi D, Grantz KH, Hamaluba M, Kazooba P, Njuguna P, et al. Immunogenicity and safety of fractional doses of yellow fever vaccines: a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *The Lancet*. 2021;397(10269):119–27.

64. 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 Intern Med.* 2018;169(11):761–5.
65. Luppe MJ, Verro AT, Barbosa AS, Nogueira ML, Undurraga EA, da Silva NS. Yellow fever (YF) vaccination does not increase dengue severity: A retrospective study based on 11,448 dengue notifications in a YF and dengue endemic region. *Travel Med Infect Dis.* 2019;30:25–31.
66. Lindsey NP, Schroeder BA, Miller ER, Braun MM, Hinckley AF, Marano N, et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine.* 2008;26(48):6077–82.
67. Thomas RE, Lorenzetti DL, Spragins W, Jackson D, Williamson T. The safety of yellow fever vaccine 17D or 17DD in children, pregnant women, HIV+ individuals, and older persons: Systematic review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2012;86(2):359–72.
68. Engel AR, C Vasconcelos PF, McArthur MA, Barrett ADT. Characterization of a viscerotropic yellow fever vaccine variant from a patient in Brazil. *Vaccine.* 2006;24(15):2803–9.
69. T.P. M, Monath TP. Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. *Expert Rev Vaccines.* 2012 Apr;11(4):427–48.
70. Porudominsky R, Gotuzzo EH. Yellow fever vaccine and risk of developing serious adverse events: A systematic review. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health.* 2018;42:1–17.
71. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos F. Vacina Febre Amarela (Atenuada) [Internet]. 2016. p. 25. Available from: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=14091032016&pIdAnexo=3189203
72. Martins RM, Maia MDLS, Farias RHG, Camacho LAB, Freire MS, Galler R, et al. 17DD yellow fever vaccine: A double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(4):879–88.
73. Bifani AM, Ong EZ, de Alwis R. Vaccination and Therapeutics: Responding to the Changing Epidemiology of Yellow Fever. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2020;12(3):349–60.
74. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *Journal of Clinical Virology.* 2015;64:160–73.

75. Galler R, Freire MS, Jabor A V., Mann GF. The yellow fever 17D vaccine virus: Molecular basis of viral attenuation and its use as an expression vector. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997;30(2):157–68.
76. Barrows NJ, Campos RK, Liao KC, Prasanth KR, Soto-Acosta R, Yeh SC, et al. *Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses*. *Chem Rev*. 2018 Apr 25;118(8):4448–82.
77. Mourosi JT, Awe A, Jain S, Batra H. *Nucleic Acid Vaccine Platform for DENGUE and ZIKA Flaviviruses*. Vol. 10, *Vaccines*. MDPI; 2022.
78. Caldwell HS, Pata JD, Ciota AT. *The Role of the Flavivirus Replicase in Viral Diversity and Adaptation*. Vol. 14, *Viruses*. MDPI; 2022.
79. Tan TY, Fibriansah G, Lok SM. Capsid protein is central to the birth of flavivirus particles. *PLoS Pathog*. 2020;16(5):1–8.
80. CM R, EM L, SR E, SJ S, RL S, JH S. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*. 1985;229(4715).
81. Bonaldo MC, Gómez MM, Dos Santos AAC, De Abreu FVS, Ferreira-de-Brito A, De Miranda RM, et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(6):447–51.
82. Giovanetti M, Pinotti F, Zanluca C, Fonseca V, Nakase T, Koishi AC, et al. Genomic epidemiology sheds light on the recent spatio-temporal dynamics of Yellow Fever virus and the spatial corridor that fueled its ongoing emergence in southern Brazil. 2023;
83. D M, E D, M B, R L de O, AC V, G B. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Rep*. 2017;7(1).
84. Lennette EH. Interference between animal viruses. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 1951;5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12977137>
85. F D. Viral interference and interferon. *Ric Clin Lab*. 1975;5(3).
86. Findlay GM, Jmacallum FO. An Interference Phenomenon in Relation to Yellow Fever and Other Viruses. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 1937;44(2):405–24.
87. Pérez-Losada M, Arenas M, Galán JC, Palero F, González-Candelas F. Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. Vol. 30, *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier; 2015. p. 296–307.

88. EC H, M W, A R. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol Biol Evol.* 1999;16(3).
89. Kim H, Webster RG, Webby RJ. Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunol.* 2018 Mar;31(2):174–83.
90. McGee CE, Tsetsarkin KA, Guy B, Lang J, Plante K, Vanlandingham DL, et al. Stability of yellow fever virus under recombinatory pressure as compared with chikungunya virus. *PLoS One.* 2011;6(8).
91. Chen S, Wu Z, Wang M, Cheng A. Innate immune evasion mediated by flaviviridae non-structural proteins. *Viruses.* 2017;9(10):1–19.
92. Manet C, Roth C, Tawfik A, Cantaert T, Sakuntabhai A, Montagnetelli X. Host genetic control of mosquito-borne Flavivirus infections. *Mammalian Genome* [Internet]. 2018;29(7–8):384–407. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00335-018-9775-2>
93. EA J, RE L, TJ G, DT M, U M, WW K. Yellow fever vaccination elicits broad functional CD4+ T cell responses that recognize structural and nonstructural proteins. *J Virol* [Internet]. 2013;87(23). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24049183>
94. Watson AM, Klimstra WB. T cell-mediated immunity towards yellow fever virus and useful animal models. *Viruses.* 2017;9(4).
95. ter Meulen J, Sakho M, Koulemou K, Magassouba N, Bah A, Preiser W, et al. Activation of the Cytokine Network and Unfavorable Outcome in Patients with Yellow Fever. *J Infect Dis.* 2004;190(10):1821–7.
96. Carvalho MLG, Falcão LFM, Lopes J da C, Mendes CCH, Olímpio FA, Miranda VDSC, et al. Role of Th17 Cytokines in the Liver's Immune Response during Fatal Yellow Fever: Triggering Cell Damage Mechanisms. *Cells.* 2022 Jul 1;11(13).
97. Adam A, Cuellar S, Wang T. Memory B cell and antibody responses to flavivirus infection and vaccination. *Fac Rev.* 2021 Jan 25;10.
98. L M, J E, GD V. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* [Internet]. 2016;45(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27653600>
99. Stockes A, Bauer J, Hudson NP. The transmission of Yellow Fever to macacus rhesus. *JAMA.* 1928;90(4):253–4.
100. Bauer ASJH, Hudson NP. Experimental Transmission of Yellow Fever to Laboratory Animals in: *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* Volume s1-8 Issue 2 (1928). 2023; Available from: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/s1-8/2/article-p103.xml>

101. B P, JZ O, HI N, R R, DA K. Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. *Immunol Rev* [Internet]. 2013;255(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23947360>
102. Liang H, Lee M, Jin X. Guiding dengue vaccine development using knowledge gained from the success of the yellow fever vaccine. *Cell Mol Immunol*. 2016;13(1):36–46.
103. Bovay A, Marraco SAF, Speiser DE. Yellow fever virus vaccination: an emblematic model to elucidate robust human immune responses. *Hum Vaccin Immunother*. 2021;00(00):1–11.
104. Casadevall A. Passive Antibody Therapies: Progress and Continuing Challenges. *Clinical Immunology*. 1999 Oct;93(1):5–15.
105. Volk DE, May FJ, A Gandham SH, Anderson A, Von Lindern JJ, C Beasley DW, et al. Structure of Yellow Fever Virus Envelope Protein Domain III. *Virology*. 2009;394(1):12–8.
106. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Viol J*. 2016;13(1):1–10.
107. Sandberg JT, Ols S, Löfling M, Varnaité R, Lindgren G, Nilsson O, et al. Activation and Kinetics of Circulating T Follicular Helper Cells, Specific Plasmablast Response, and Development of Neutralizing Antibodies following Yellow Fever Virus Vaccination. *The Journal of Immunology*. 2021 Aug 15;207(4):1033–43.
108. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015 Feb 20;15(3):160–71.
109. Michael P Cancro, Mary M Tomayko. Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunol Rev* [Internet]. 2021;303(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34396546>
110. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13–22.
111. Waggoner JJ, Rojas A, Pinsky BA. Yellow fever virus: Diagnostics for a persistent arboviral threat. *J Clin Microbiol*. 2018 Oct 1;56(10).
112. D H, G L, AZ W, ND F, LMS R, AL T, et al. Genotype-specific features reduce the susceptibility of South American yellow fever virus strains to vaccine-induced antibodies. *Cell Host Microbe*. 2022;30(2).
113. Escosteguy CC, Pereira AGL, Marques MRVE, de Araujo Lima TR, Galliez RM, de Andrade Medronho R. Yellow fever: Profile of cases and factors associated with death in a hospital in the State of Rio de Janeiro, 2017-2018. *Rev Saude Publica*. 2019;53:1–12.

114. de Ávila RE, José Fernandes H, Barbosa GM, Araújo AL, Gomes TCC, Barros TG, et al. Clinical profiles and factors associated with mortality in adults with yellow fever admitted to an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil. Vol. 93, *International Journal of Infectious Diseases*. 2020. 90–97 p.
115. Ho YL, Joelsons D, Leite GFC, Malbouisson LMS, Song ATW, Perondi B, et al. Severe yellow fever in Brazil: Clinical characteristics and management. *J Travel Med*. 2019;26(5):1–7.
116. Bom Dia SP. Mais de 900 mil pessoas já tomaram a vacina contra febre amarela na cidade de SP em 2018 [Internet]. Vol. 2023. 2018. Available from: <https://g1.globo.com/sp/sao-paulo/noticia/mais-de-900-mil-pessoas-ja-tomaram-a-vacina-contr-febre-amarela-na-cidade-de-sp-em-2018.ghtml>
117. Diniz LMO, Romanelli RM de C, Bentes AA, Silva NLC da, Soares Cruzeiro FR, Marcial TM, et al. Yellow fever in children and adolescents previously immunized in Minas Gerais State, Brazil. *Vaccine*. 2020;38(44):6954–8.
118. Centers for Disease Control. Measles, Mumps, and Rubella (MMR) Vaccination [Internet]. Vol. 2022. 2021. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/mmr/public/index.html>
119. Divisão de Imunização, Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória, Centro de Vigilância Epidemiológica, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde. Atualização das medidas de controle Sarampo/Rubéola - Estado de São Paulo, fevereiro/2014 [Internet]. 2014 [cited 2023 Oct 25]. Available from: https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/sindrome-da-rubeola-congenita-src/doc/2014_sarampo_medida_controle.pdf
120. Centers for Disease Control and Prevention. Viral hepatitis - Postexposure Prophylaxis [Internet]. 2020 [cited 2023 Oct 26]. Available from: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/pep.htm>
121. da Silva VHIA. Avaliação da imunogenicidade e reatogenicidade da vacina contra febre amarela em pessoas que vivem com HIV [Internet]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2015 [cited 2022 Oct 31]. Available from: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5134/tde-06012016-112024/publico/VivianHelenalidaAvelinodaSilva.pdf>
122. Lambeth CR, White LJ, Johnston RE, De Silva AM. Flow Cytometry-Based Assay for Titrating Dengue Virus. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3267–72.

123. Kraus AA, Messer W, Haymore LB, De Silva AM. Comparison of plaque- and flow cytometry-based methods for measuring dengue virus neutralization. *J Clin Microbiol.* 2007 Nov;45(11):3777–80.
124. Katoh K, Immunology Frontier Research Center Osaka University SOJ, Computational Biology Research Center TNI of AIS, Technology (AIST) Tokyo J, Standley DM, Immunology Frontier Research Center Osaka University SOJ. MAFFT Multiple Sequence Alignment Program Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol.* 2013;30(4):772–80.
125. Larsson A, Systematic Biology Department of Organismal Biology EBCUUU 75236 S. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics.* 2014;30(22):3276–8.
126. C F, MC T, P P, A MS, EA G, RN C, et al. Lineage-Specific Real-Time RT-PCR for Yellow Fever Virus Outbreak Surveillance, Brazil. *Emerg Infect Dis [Internet].* 2017;23(11). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28949285>
127. Moreira Salles AP, de Seixas Santos Nastro AC, Ho YL, Vilas Boas Casadio L, Emanuel Amgarten D, Justo Arévalo S, et al. Updating the Phylodynamics of Yellow Fever Virus 2016–2019 Brazilian Outbreak With New 2018 and 2019 São Paulo Genomes. *Front Microbiol.* 2022 Apr 14;13.
128. Delatorre E, Vieira Santos de Abreu F, Pereira Ribeiro I, Martínez M, Araújo Cunha dos Santos A, Ferreira-de-Brito A, et al. Distinct YFV lineages co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian regions from 2015 to 2018.
129. Claro IM, Ramundo MS, Coletti TM, da Silva CAM, Valença IN, Candido DS, et al. Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing. *Wellcome Open Res.* 2021;6(241).
130. Minh BQ, of Computer Science Australian National University CACTA, of Ecology D, Evolution Research School of Biology ANU/CACTA, Schmidt HA, for Integrative Bioinformatics Vienna Max Perutz Labs U of V, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol.* 2020;37(5):1530–4.
131. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermiin LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods [Internet].* 2017;14(6):587–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nmeth.4285>
132. Hoang DT, of Information Technology U of E, Technology Vietnam National University HV, Chernomor O, for Integrative Bioinformatics Vienna Max F. Perutz Laboratories U of VMUVVA, von Haeseler A, et al. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol Biol Evol.* 2017;35(2):518–22.

133. Rambaut A. FigTree [Internet]. code is available from GitHub.; 2007. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/programa/figtree/>
134. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2020. Available from: <https://www.r-project.org/>
135. Campi-Azevedo AC, de Almeida Estevam P, 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 Jun 15;14(1).
136. KR C, AA I, G T, CS R, HC Y, M R, et al. Serological cross-reactivity among common flaviviruses. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2022;12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36189346>
137. Bennett JEDRBMJ. Mandel, Douglas and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases. 8th ed. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. Vol. 1. Elsevier; 2015.
138. Mokaya J, Kimathi D, Lambe T, Warimwe GM. What constitutes protective immunity following yellow fever vaccination? *Vaccines (Basel)*. 2021;9(6).
139. Wec AZ, Haslwanter D, Abdiche YN, Shehata L, Pedreño-Lopez N, Moyer CL, et al. Longitudinal dynamics of the human B cell response to the yellow fever 17D vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(12):6675–85.
140. Akatsuka M, Tatsumi H, Sonoda T, Masuda Y. Low immunoglobulin G level is associated with poor outcomes in patients with sepsis and septic shock. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection.* 2021 Aug;54(4):728–32.
141. MD G, JE S, AD BE, JG B, GS B, LA C, et al. Viscerotropic disease: case definition and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine.* 2012;30(33).
142. Anderson KB, of Epidemiology Rollins School of Public Health EUAG, Gibbons R V, of Virology Armed Forces Research Institute of Medical Sciences BT, Edelman R, of Medicine D, et al. Interference and Facilitation Between Dengue Serotypes in a Tetravalent Live Dengue Virus Vaccine Candidate. *J Infect Dis.* 2011;204(3):442–50.
143. EH L, H K. INTERFERENCE BETWEEN VIRUSES IN TISSUE CULTURE. *J Exp Med* [Internet]. 1946;83(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19871525>
144. Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Eventos Adversos Sérios Associados com a Vacina 17D contra a Febre Amarela [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 26]. Available from:

- https://saude.campinas.sp.gov.br/doencas/febre_amarela/eventos_adversos_serios.pdf
145. Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. *PLoS Comput Biol*. 2009 Sep 25;5(9):e1000520.
 146. Gómez MM, de Abreu FVS, Dos Santos AAC, de Mello IS, Santos MP, Ribeiro IP, et al. Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016-2017 Brazilian outbreak. *Journal of General Virology*. 2018;99(4):536–48.
 147. Giovanetti M, Pinotti F, Zanluca C, Fonseca V, Nakase T, Koishi AC, et al. Genomic epidemiology unveils the dynamics and spatial corridor behind the Yellow Fever virus outbreak in Southern Brazil. *Sci Adv*. 2023 Sep;9(35).
 148. Fundação Oswaldo Cruz. Vacina de febre amarela será ampliada para todo o país [Internet]. 2018 [cited 2023 Oct 27]. Available from: <https://portal.fiocruz.br/noticia/vacina-de-febre-amarela-sera-ampliada-para-todo-o-pais#:~:text=Todo%20o%20territ%C3%B3rio%20brasileiro%20ser%C3%A1,conclu%C3%ADda%20at%C3%A9%20abril%20de%202019>.
 149. de Gier B, Huiberts AJ, Hoeve CE, den Hartog G, van Werkhoven H, van Binnendijk R, et al. Effects of COVID-19 vaccination and previous infection on Omicron SARS-CoV-2 infection and relation with serology. *Nat Commun*. 2023 Aug 9;14(1):4793.
 150. de Jesus MAS, Hojo-Souza NS, Moraes TR, Guidoni DL, de Souza FSH. Profile of Brazilian inpatients with COVID-19 vaccine breakthrough infection and risk factors for unfavorable outcome. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2022;1–10.
 151. Zhu X, Gebo KA, Abraham AG, Habtehyimer F, Patel EU, Laeyendecker O, et al. Dynamics of inflammatory responses after SARS-CoV-2 infection by vaccination status in the USA: a prospective cohort study. *Lancet Microbe*. 2023 Sep;4(9):e692–703.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Sequências públicas utilizadas na análise filogenética do vírus da febre amarela.

Nome do isolado	Hospedeiro	Local de isolamento	Data de coleta	Número de acesso
Asibi	Homo sapiens	Gana	1927	AY640589
17DD-Brasil	NA	Brasil	2006	DQ100292
17D-204	NA	NA	2013	KF769015
ES-504	Alouatta sp	Brasil, ES, Domingos Martins	20/02/2017	KY885000
ES-505	Alouatta sp	Brasil, ES, Domingos Martins	22/02/2017	KY885001
ESS1115- H844801	Homo sapiens	Brasil, ES, Vitória	28/02/2017	MF370531
MIG2482- H843297	Homo sapiens	Brasil, MG, São Francisco	10/01/2017	MF370532
MIG2484- H843301	Homo sapiens	Brasil, MG, Ladainha	11/01/2017	MF370533
RJ87	Alouatta sp	Brasil, RJ, Macaé	04/04/2017	MF423375
RJ95	Alouatta sp	Brasil, RJ, Carmo	19/04/2017	MF423377
H190	Homo sapiens	Brasil, RJ, São Fidelis	16/03/2017	MF538782
H191	Homo sapiens	Brasil, RJ, Casimiro de Abreu	18/03/2017	MF538783
YFV/Monkey/Br asil/2017/Y3	Alouatta sp	Brasil, SP, Louveira	09/17	MH030051
YFV/Monkey/Br asil/2017/Y5	Alouatta sp	Brasil, SP, Itatiba	30/08/2017	MH030053
YFV/Monkey/Br asil/2018/SA129	Alouatta sp	Brasil, SP, Guarulhos	09/01/2018	MH193173
YFV/Monkey/Br asil/2018/SA131	Alouatta sp	Brasil, SP, São Paulo	01/02/2018	MH193175
ARB1005	Homo sapiens	Brasil, SP, São Paulo	08/01/2018	MK333798
ARB1009	Homo sapiens	Brasil, SP, São Paulo	08/01/2018	MK333799

Continua na próxima página

Continuação

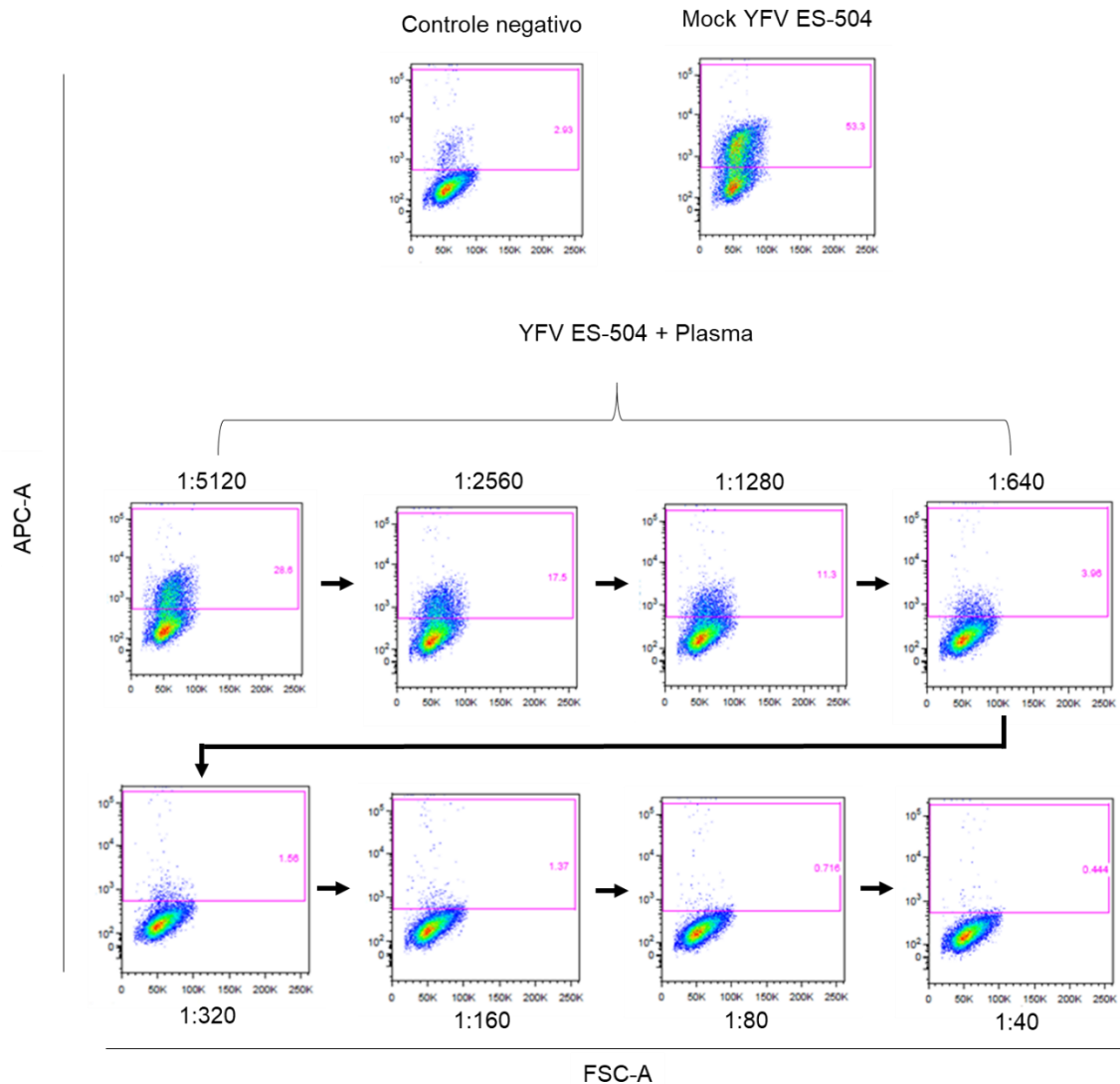
Nome do isolado	Hospedeiro	Local de isolamento	Data de coleta	Número de acesso
RJ155	Alouatta sp	Brasil, RJ, Casimiro de Abreu	10/01/2019	MK533792
YFV003FIG	Homo sapiens	Brasil, SP, Mairiporã	12/01/2018	MK583147
YFV005FIG	Homo sapiens	Brasil, SP, São Paulo	16/01/2018	MK583149
YFV007FIG	Homo sapiens	Brasil, SP, Itaquaquecetuba	15/01/2018	MK583150
YFV010FIG	Homo sapiens	Brasil, SP, Ibiúna	16/01/2017	MK583152
YFV020FIG	Homo sapiens	Brasil, SP, Atibaia	23/01/2018	MK583156
YFV021FIG	Homo sapiens	Brasil, SP, Guarulhos	23/01/2018	MK583157
YFV029FIG	Homo sapiens	Brasil, SP, Cotia	29/01/2018	MK583160
0042/18_IV	Alouatta sp	Brasil, MG, Juiz de Fora	05/01/2018	ON022240
0053/18_IV	Alouatta sp	Brasil, MG, Juiz de Fora	02/01/2018	ON022241
0136/18 FA_vaccinated	Homo sapiens	Brasil, MG, Mariana	16/01/2018	ON022250
0163/18 FA_vaccinated	Homo sapiens	Brasil, MG, Brumadinho	17/01/2018	ON022253
5148	Alouatta sp	Brasil, SP, Iporanga	21/01/2019	ON022367
3048/2018	Alouatta sp	Brasil, RJ, Angra dos Reis	26/02/2018	ON022433
3052/2018	Alouatta sp	Brasil, RJ, Angra dos Reis	26/02/2018	ON022436
CP46	Homo sapiens	Brasil, SP, Iporanga	20/01/2019	ON022558
CP49	Homo sapiens	Brasil, SP, Cajati	31/01/2019	ON022559
CP50	Homo sapiens	Brasil, SP, Barra do Turvo	06/02/2019	ON022560
CP51	Homo sapiens	Brasil, SP, Barra do Turvo	07/02/2019	ON022561

Continua na próxima página

Continuação

Nome do isolado	Hospedeiro	Local de isolamento	Data de coleta	Número de acesso
CP52	Homo sapiens	Brasil, SP, Barra do Turvo	07/02/2019	ON022562
CP24	Homo sapiens	Brasil, SP, Iporanga	20/01/2019	ON022563
isolada	Alouatta sp	Brasil, SP, São Paulo	15/01/2019	ON022696
ARB1019	Homo sapiens	Brasil, SP, São Paulo	16/01/2018	ON022736
ARB1029	Homo sapiens	Brasil, SP, Mairiporã	19/01/2018	ON022737
ARB1030	Homo sapiens	Brasil, SP, Atibaia	19/01/2018	ON022738
ARB1032	Homo sapiens	Brasil, SP, Guarulhos	23/01/2018	ON022739
ARB1045	Homo sapiens	Brasil, SP, Mairiporã	30/01/2018	ON022740
ARB1055	Homo sapiens	Brasil, SP, São Paulo	01/02/2018	ON022741
ARB1014	Homo sapiens	Brasil, SP, Guarulhos	12/01/2018	ON022742
ARB1020	Homo sapiens	Brasil, SP, Mairiporã	16/01/2018	ON022743
ARB1036	Homo sapiens	Brasil, SP, Guarulhos	23/01/2018	ON022744
ARB1042	Homo sapiens	Brasil, SP, São Paulo	24/01/2018	ON022745
ARB1051	Homo sapiens	Brasil, SP, São Paulo	2018	ON022746

APÊNDICE B. Estratégia de análise do ensaio de neutralização por citometria de fluxo (FNT) com o vírus da febre amarela selvagem.



Representação dos resultados obtidos após ensaio de neutralização por citometria de fluxo (FNT) com YFV ES-504 e plasma de paciente infectado com o YFV selvagem. O controle negativo representa apenas células Vero, sem presença de vírus, e o *mock* representa o potencial total de infecção dos vírus nas células Vero, sem amostra de plasma. Com adição de amostra de plasma de paciente infectado, após 30 dias do início dos sintomas, é possível observar a neutralização progressiva do vírus. Em uma diluição alta da amostra (1:5120), a quantidade de células positivas é próxima à do *mock*. Conforme a quantidade de anticorpos neutralizantes vai aumentando, ou seja, a amostra vai sendo menos diluída, a quantidade de células positivas diminui para valor próximo de 0 (1:40).