

CLARISSA DE CASTRO FERREIRA

**IMUNIDADE VACINAL ANTIAMARÍLICA EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE EM USO DE TERAPIAS
IMUNOMODULADORAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília – UnB para obtenção de título de Doutora em Ciências Médicas.

Área de concentração: Reumatologia e Imunologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Licia Maria Henrique da Mota

**Brasília
2019**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____ **Data:** _____

dC355 de Castro Ferreira, Clarissa
IMUNIDADE VACINAL ANTIAMARÍLICA EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE EM USO DE TERAPIAS IMUNOMODULADORAS /
Clarissa de Castro Ferreira; orientador Licia Maria
Henrique da Mota. -- Brasília, 2019.
157 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) --
Universidade de Brasília, 2019.

1. Terapia imunomoduladora. 2. Vacina da Febre Amarela.
3. Anticorpos neutralizantes. 4. Imunidade celular. 5.
Artrite reumatoide . I. Henrique da Mota, Licia Maria,
orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, a quem devo todas as minhas conquistas, base e suporte de toda a minha vida.

Ao Augusto, meu amado esposo, apoio incondicional em todos os meus projetos, que sempre me acalma com seu sorriso e abraço reconfortante.

Aos meus amados filhos, Arthur e João Victor, presentes de Deus na minha vida, fonte diária de amor e motivação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, agradeço por esta oportunidade de aprender. Agradeço Sua presença em minha vida, guiando-me pelo caminho.

À minha querida orientadora Dra. Licia agradeço a confiança depositada em mim. Obrigada por sua disponibilidade, generosidade e ensinamentos ao longo dessa jornada. Tenho muito orgulho de ser sua aluna!

À querida amiga Ana Cristina, por ter me ajudado em todas as etapas da pesquisa. Agradeço por sua amizade, tão especial para mim.

Ao dr. Olindo, grande pesquisador, com quem muito aprendi sobre a vacina da febre amarela. Obrigada por sua gentileza e paciência.

À dra. Andrea, pelas suas valiosas contribuições a esse trabalho.

Às doutoras Ana Carolina e Vanessa, que tão bem me acolheram na FIOCRUZ, sempre solícitas às minhas dúvidas.

À Juciléia, por seu carinho e atenção comigo, nas minhas idas a Belo Horizonte.

Ao grupo de Febre Amarela do Instituto de Pesquisas René-Rachou, que trabalhou com afincamento e dedicação nas análises laboratoriais.

Aos queridos dr. Cleandro, dra. Luciana, dr. Cezar Kozak, dr. Leandro Crispim e dra. Talita, que me permitiram frequentar seus ambulatórios e estudar seus pacientes.

Ao querido professor Dr. Aires, grande mestre da reumatologia, sempre incentivando seus alunos ao crescimento pessoal e profissional.

À Wilma, pela sua inestimável ajuda na coleta de amostras sanguíneas e pela convivência alegre.

À toda equipe da FIOCRUZ- Brasília, pelo apoio na logística das amostras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UnB e aos professores.

Ao Alessandro e Isabela, que muito me ajudaram na parte burocrática do curso.

Ao Luís Henrique, excelente desenhista, que fez as ilustrações da tese.

Aos meus familiares, da minha família de origem e da família que me acolheu, por sempre me apoiarem e torcerem por mim.

A todos os participantes da pesquisa, que, pelo bem da ciência, contribuíram com seu próprio sangue. Sem vocês, nada disso seria possível.

À minha querida mãe, minha maior incentivadora, agradeço pelo amor, paciência e compreensão.

Ao meu querido pai, pelos ensinamentos de vida e por ser um grande exemplo para mim.

Ao meu irmão André e cunhada Isabela, pelo apoio e incentivo mesmo à distância.

Aos meus queridos sogros Ana Maria e Junior, pela torcida e pelos bons momentos de descontração.

Ao meu amado esposo Augusto, por ser meu porto seguro e me apoiar nos momentos difíceis. Amar você torna a minha vida mais bela!

Aos meus amados filhos, Arthur e João Victor, por alegrarem e iluminarem meus dias. Por vocês, me esforço para ser cada vez melhor.

Gratidão eterna a todas as pessoas que cruzaram o meu caminho nessa jornada, e que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

"I like to feel that in honoring me you are honoring all the workers in the laboratory, field, and jungle who have contributed so much, often under conditions of hardship and danger, to our understanding of this disease. I would also like to feel that you are honoring the memory of those who gave their lives in gaining knowledge which was of inestimable value. They were truly martyrs of science, who died that others might live."

Max Theiler (1899-1972) , em seu discurso ao ganhar o Prêmio Nobel de Medicina, por sua descoberta da vacina contra a febre amarela. Estocolmo, 10 de dezembro de 1951.

Ferreira, CC. Imunidade vacinal antiamarilica em pacientes com artrite reumatoide em uso de terapias imunomoduladoras [tese]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 2019.

RESUMO

Introdução: A vacina antiamarilica 17DD promove uma resposta imunológica de longa duração, com indução de células de memória tanto da linhagem humoral quanto celular. O tratamento da artrite reumatoide (AR) com medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD) pode impactar a resposta vacinal protetora da vacina 17DD em indivíduos previamente vacinados, e, dessa maneira, aumentar o risco de infecção nesta população. O objetivo do trabalho foi determinar se o uso de terapias imunomoduladoras poderia afetar a duração da imunidade protetora contra a febre amarela em pacientes com AR.

Métodos: Cento e vinte e dois indivíduos com AR, previamente imunizados com a vacina 17DD (nos períodos de [1-5) anos, [5-10) anos e ≥ 10 anos), foram selecionados para participar do estudo. Os participantes foram divididos de acordo com a terapia imunomoduladora em uso: MMCD sintéticos convencionais (MMCDsc) ou associação de MMCD sintéticos e biológicos (MMCDsc+b). O grupo controle (CONT) compôs-se de 226 indivíduos saudáveis. Realizaram-se dosagem de anticorpos neutralizantes pelo teste de redução de plaques (PRNT) e análise da imunidade celular por meio de citometria de fluxo.

Resultados: Os resultados obtidos mostram que a terapia com MMCD sintéticos não afetou a duração da imunidade protetora induzida pela vacina 17DD, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, a associação de MMCD sintéticos e biológicos levou a uma depleção prematura dos principais biomarcadores de memória imunológica associada à vacina antiamarilica, com redução da soropositividade mensurada pelo PRNT entre [5-9) anos pós-vacinação e com baixos níveis de células de memória efetora TCD8⁺ até 5 anos pós-vacinação.

Conclusão: Infere-se, a partir destes resultados, que esta população está vulnerável à infecção amarilica e poderia beneficiar-se de uma estratégia de reforço vacinal planejada.

Palavras-chave: Terapia imunomoduladora. Vacina da Febre Amarela. Anticorpos neutralizantes. Imunidade celular. Artrite reumatoide.

Ferreira, CC. Imunidade vacinal antiamarilica em pacientes com artrite reumatoide em uso de terapias imunomoduladoras [thesis]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 2019.

ABSTRACT

Background: The 17DD-Yellow Fever (YF) vaccine induces a long-lasting protective immunity, resulting from humoral and cellular immunological memory. The treatment of rheumatoid arthritis (RA) patients with disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARD) may affect pre-existing 17DD-vaccine protective immunity and increase the risk of acquiring YF infection. Our goal was to determine whether DMARD would affect the duration of YF-specific protective immunity in RA patients.

Methods: A total of 122 RA patients, previously immunized with the 17DD-YF vaccine (1-5, 5-9 and ≥ 10 years) and currently under DMARD therapy, were enrolled in the present investigation. Immunomodulatory therapy encompasses the use of conventional synthetic DMARD alone (csDMARD) or combines with biological DMARD (cs+bDMARD). A total of 226 healthy subjects were recruited as a control group (CONT). Neutralizing antibody responses were measured by a plaque-reduction neutralizing test (PRNT), and cellular immunity was evaluated by an *in vitro* 17DD-YF-specific peripheral blood lymphoproliferative assay.

Results: The data demonstrated that csDMARD therapy did not affect the duration of protective immunity induced by the 17DD-YF vaccine compared to that of CONT, as both presented a significant time-dependent decline at 10 years after vaccination. Conversely, cs+bDMARD therapy induced a premature depletion in the main determinants of the vaccine protective response, with diminished PRNT seropositivity levels between 5-9 years and impaired Effector Memory in CD8⁺ T-cells as early as 1-5 years after 17DD-YF vaccination.

Conclusions: These findings could support changing the vaccination schedule of this population, with the possibility of a planned booster dose upon the suspension of bDMARD in cases where this is allowed, even before ten years following 17DD-YF vaccination. The benefit of a planned booster dose should be evaluated in further studies.

Keywords: Immunomodulation. Yellow Fever Vaccine. Antibodies, Neutralizing. Immunity, Cellular. Arthritis, Rheumatoid

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Os ciclos de transmissão da febre amarela: silvestre, urbano e intermediário..... | 19 |
| Figura 2: Casos humanos (A) e epizootias em primatas não humanos (B) confirmados para a febre amarela, Brasil, período de monitoramento 2014/2015 | 20 |
| Figura 3. Série histórica do número de casos humanos confirmados para FA e sua letalidade, no Brasil, de 1980 a junho de 2018..... | 22 |
| Figura 4: Áreas com risco de transmissão da febre amarela na África..... | 23 |
| Figura 5: Lesões histopatológicas causadas pelo vírus amarílico..... | 27 |
| Figura 6: Principais alterações imunológicas provocadas pelas vacinas antiamarílicas plotadas em uma linha do tempo..... | 39 |
| Figura 7: Principais alterações imunológicas provocadas pelas vacinas antiamarílicas..... | 40 |
| Figura 8. Eventos imunológicos no tecido sinovial em pacientes com AR..... | 53 |
| Figura 9. Cascata de transdução de sinais que ocorrem no interior da célula em pacientes com AR..... | 54 |
| Figura 10. População de estudo..... | 64 |
| Figura 11: Estratégia de análise do perfil fenotípico em linfócitos T CD4 ⁺ após cultura <i>in vitro</i> de 6 dias de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos controle saudáveis e de indivíduos com AR..... | 72 |
| Figura 12. Estratégia de análise de linfócitos T e B de memória..... | 73 |
| Figura 13. Estratégia de análise de linfócitos T e B produtores de citocinas..... | 74 |
| Figura 14. Grupos de AR e atividade de doença mensurada pelos índices compostos de atividade de doença..... | 84 |
| Figura 15. Dosagem dos níveis de anticorpos neutralizantes em pacientes submetidos à terapia imunomoduladora após vacinação com 17DD..... | 85 |
| Figura 16. Biomarcadores fenotípicos de memória em pacientes em uso de terapia imunomoduladora após vacinação com 17DD..... | 88 |

Figura 17. Perfil de biomarcadores funcionais em indivíduos sob uso de terapia imunomoduladora após vacinação com 17DD.....91

Figura 18. Curvas de assinaturas de biomarcadores de indivíduos saudáveis antes e após vacinação com 17DD.....95

Figura 19. Curvas de assinatura de biomarcadores fenotípicos e funcionais de memória em indivíduos com AR em uso de terapia imunomoduladora.....97

Figura 20. Diagramas de Venn de biomarcadores fenotípicos e funcionais de memória em indivíduos com AR em uso de terapia imunomoduladora.....99

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Descrição das proteínas virais estruturais e não estruturais e suas funções..... | 25 |
| Tabela 2. Dados demográficos, registros clínicos e terapia imunomodulatória em pacientes com AR..... | 82 |
| Tabela 3. MMCD sintéticos e biológicos e intervalo mínimo de suspensão para realizar vacinação com vacinas de vírus vivo..... | 107 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABT -abatacepte
ACPA- anticorpos contra peptídeos citrulinados
ACR – Colégio Americano de Reumatologia
ADA - adalimumabe;
AIDS –síndrome da imunodeficiência adquirida
AML - drogas antimaláricas (hidroxicloroquina e difostato de cloroquina);
AR – artrite reumatoide
AZA -azatioprina;
C -proteína do capsídeo viral
CC cultura controle
CCR2- receptor de quimiocina CC do tipo 2
CCR4 – receptor de quimiocina CC do tipo 4
CCR5 – receptor de quimiocina CC do tipo 5
CCR7- receptor de quimiocina CC do tipo 7
CD cluster de diferenciação
CDAI –índice clínico de atividade de doença
CDs – células dendríticas
CE cultura estimulada
CG - glucocorticóides
CMCD19 – linfócitos B de memória clássica
CMCD4 – linfócitos T CD4 de memória central
CMCD8 – linfócitos T CD8 de memória central
CONT – grupo controle
cs+bDMARD – grupo de indivíduos com AR em uso de terapia combinada: DMARD sintéticos e biológicos.
csDMARD – grupo de indivíduos com AR em uso de DMARD sintéticos
CTLA-4 -antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
CTZ - certolizumabe;
CXCR3 – receptor de quimiocina CXC do tipo 3
CYC -ciclosporina;
DAS28–escore de atividade de doença
DMARD – medicamentos modificadores da atividade de doença
DNA-VFA – doença neurológica aguda associada à vacina da febre amarela
DVA-VFA – doença viscerotrópica aguda associada à vacina da febre amarela
E proteína do envelope
EA espondiloartrite
EAG-VFA – eventos adversos graves associados à vacina da febre amarela
EAPV – eventos adversos pós-vacinação
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
eEfCD4 – linfócitos T CD4 early effector
eEfCD8 – linfócitos T CD8 early effector
EMCD4- linfócitos T CD4 de memória efetora
EMCD8 – linfócitos T CD8 de memória efetora
ES- esclerose sistêmica
ETN - etanercepte;
EULAR–Liga europeia contra o reumatismo

FA febre amarela
Fas – antígeno de apoptose 1
FGF – fator de crescimento de fibroblastos
FIOCRUZ – Fundação Osvaldo Cruz
FoxP3-forkhead box P3
FR fator reumatoide
FSC – dispersão para frente
GMCSF- fator estimulador da colônia de monócitos e granulócitos
GOL - golimumabe;
HCQ – hidroxicloroquina
HIV –vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR antígeno leucocitário humano
IC intervalo de confiança
IFIT - Interferon induced proteins with Tetratricopeptide Repeat motifs
IFN- γ - interferon gama
IFX -infliximabe;
IH –antígeno inibidor da hemaglutinação
IL-10 interleucina 10
IL-10R – receptor da interleucina 10
IL-12 interleucina 12
IL-18 interleucina 18
IL-1a- interleucina 1 a
IL-1b – interleucina 1b
IL-2 interleucina 2
IL-4 interleucina 5
IL-5 interleucina 5
IL-6 interleucina 6
IP-10 CXCL10- proteína 10 induzida por interferon gama
IRF7 – fator regulador de interferon 7
ISG – gene estimulador de interferon
JAK/STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição do sistema Janus-kinase
LEF -leflunomida;
LES lúpus eritematoso sistêmico
MDA-5 proteína 5 associada a diferenciação do melanoma
MEM -Minimal Essential Medium
MHC – complexo principal de histocompatibilidade
MMCD – medicamentos modificadores do curso da doença
MMCDsc – grupo de indivíduos com AR em uso de MMCD sintéticos
MMCDsc+b – grupo de indivíduos com AR em uso de terapia combinada: MMCD sintéticos e biológicos.
MTX - metotrexato;
MX proteína de ligação ao GTP induzido por interferon-
NCD19 – linfócitos B naïve
NCD4 – linfócitos T CD4 naïve
NCD8 – linfócitos T CD8 naïve
nCMCD19 – linfócitos B de memória não clássica
NK células natural killer
NS1 – proteína viral não estrutura 1
NS2A – proteína viral não estrutura 2A
NS3 – proteína viral não estrutura 3

NS4A – proteína viral não estrutura 4A
NS4B – proteína viral não estrutura 4B
NS5 – proteína viral não estrutura 5
NV(dia0) – grupo de indivíduos não vacinados
OAS - 2'-5'-oligoadenilato sintetase
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBMC – células mononucleares do sangue periférico
PBS- tampão fosfato salino
PCR – reação em cadeia da polímerase
PDGF fator de crescimento derivado de plaquetas
PDN - prednisona
prM – proteína da membrana
PRNT – teste de neutralização por redução de placas
PV(dias 30-45) – grupo de indivíduos 30-45 dias após a vacinação com 17DD
RANK - receptor do ativador do fator nuclear $\kappa\beta$
RANKL – ligante do receptor do ativador do fator nuclear $\kappa\beta$
RANTES - Regulada por Ativação, Normal T Expressa e Secretada
RIG-I - retinoic acid-inducible gene-I-like
RNA – ácido ribonucleico
ROR- γ t–variante do receptor órfão relacionado ao ácido retinóico
RT-PCR - reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
RTX - rituximabe;
SBR –Sociedade Brasileira de Reumatologia
SDAI–índice simplificado de atividade de doença
SSC – dispersão lateral
SSZ -sulfassalazina;
STAT1 – transdutor de sinal e fator de transcrição 1
TCD4⁺ - linfócitos T CD4
TCD8⁺ - linfócitos T CD8
TCR- receptor do linfócito T
TCZ - tocilizumabe;
TGF α –fator de transformação de crescimento alfa
TGF- β – fator de transformação do crescimento beta
TGO – aspartato aminotransferase
TGP – alanina aminotransferase
Th- T auxiliar
TLR – receptor toll like
TNF – fator de necrose tumoral
TRAIL – ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
Treg- linfócitos T reguladores
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular
VFA – vacina da febre amarela

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1.Introdução..... | 17 |
| 1.1 Epidemiologia..... | 20 |
| 1.2 O vírus da febre amarela..... | 24 |
| 1.3 Fisiopatologia..... | 25 |
| 1.4 Resposta imune ao vírus amarílico..... | 27 |
| 1.5 Quadro clínico da FA..... | 28 |
| 1.6 Diagnóstico da FA..... | 29 |
| 1.7 Tratamento da FA..... | 29 |
| 1.8 A vacina da febre amarela..... | 30 |
| 1.8.1 Eventos adversos pós-vacinação (EAPV)..... | 31 |
| 1.8.2 Alterações imunológicas induzidas pela vacina antiamarílica..... | 32 |
| 1.8.2.1 Resposta celular inata induzida pela vacinação antiamarílica..... | 33 |
| 1.8.2.2 Resposta celular adaptativa induzida pela vacinação antiamarílica..... | 34 |
| 1.8.2.2.1 Células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ | 34 |
| 1.8.2.2.2Células B..... | 36 |
| 1.8.2.3 Resposta humoral induzida pela vacinação antiamarílica..... | 36 |
| 1.8.2.4Citocinas e quimiocinas..... | 37 |
| 1.8.3Expressão gênica | 41 |
| 1.8.4Imunidade em crianças | 41 |
| 1.8.5Imunidade em idosos..... | 42 |
| 1.8.6Vacina antiamarílica em imunossuprimidos..... | 43 |
| 1.8.6.1 Vacinação em indivíduos HIV positivos..... | 44 |
| 1.8.6.2 Vacinação em indivíduos transplantados..... | 46 |
| 1.8.6.3Vacinação em indivíduos com doenças reumáticas inflamatórias ou em uso de drogas imunossupressoras..... | 43 |
| 1.9Células de memória..... | 49 |
| 1.9.1Células T de memória | 49 |
| 1.9.2Células B de memória..... | 50 |
| 1.10Artrite reumatoide..... | 51 |
| 1.10.1 Fisiopatologia da AR..... | 51 |
| 1.10.2 Imunopatogênese da AR..... | 51 |
| 1.10.3 Diagnóstico e manejo da AR..... | 54 |
| 1.10.4. Imunomoduladores e mecanismo de ação..... | 55 |
| 2. Justificativa..... | 58 |
| 3. Objetivos | 59 |
| 3.1 objetivos gerais..... | 59 |
| 3.2 objetivos específicos..... | 59 |
| 4. Pacientes e métodos..... | 60 |
| 4.1 Participantes..... | 61 |
| 4.1.1 Critérios de inclusão..... | 62 |
| 4.1.2 Critérios de exclusão..... | 62 |
| 4.2 Métodos..... | 63 |
| 4.2.1 Amostras biológicas..... | 65 |
| 4.2.2 Titulação de anticorpos neutralizantes-PRNT..... | 65 |
| 4.2.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)..... | 67 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.4. Cultura de PBMC..... | 67 |
| 4.2.5. Imunofenotipagem de células T e B de memória..... | 68 |
| 4.2.6. Investigação das citocinas intracitoplasmáticas..... | 69 |
| 4.2.7 Investigação de linfócitos T de memória | 70 |
| 4.2.8 Investigação de linfócitos B de memória | 71 |
| 4.2.9 Estratégia de análise de linfócitos T e B produtores de citocinas pró- inflamatórias e reguladoras..... | 71 |
| 4.2.10 Análise da imunidade celular..... | 75 |
| 5. Análise estatística..... | 76 |
| 5.1 Estatística convencional..... | 76 |
| 5.2. Curvas de assinaturas de biomarcadores..... | 77 |
| 5.3. Diagramas de Venn..... | 78 |
| 6. Resultados..... | 80 |
| 6.1 Declínio precoce dos anticorpos neutralizantes no grupo de terapia imunomoduladora combinada sintética e biológica (MMCDsc+b..... | 81 |
| 6.2 Indivíduos com AR tratados com terapia imunomoduladora apresentam perfil fenotípico distinto de células de memória | 87 |
| 6.3. Indivíduos com AR em uso de terapia imunomoduladora combinada sintética e biológica apresentam declínio precoce dos marcadores funcionais específicos para o antígeno da febre amarela..... | 90 |
| 6.4. Curvas de assinaturas de biomarcadores de memória específicas para o antígeno da febre amarela em indivíduos com ar em terapia imunomoduladora..... | 93 |
| 7. Discussão..... | 100 |
| 8.Limitações do trabalho..... | 108 |
| 9.Conclusão..... | 109 |
| 10. Produções relacionadas a tese..... | 112 |
| Referências..... | 126 |
| Anexo 2- artigo publicado..... | 130 |
| Anexo 3- artigo publicado..... | 148 |



30-X-11. Operation of Miraflores Locks. First boat through. Leaving west chamber of upper lock and entering Miraflores Lake. Looking south Oct. 14, 1913.

Foto que mostra a construção do Canal do Panamá, em que cerca de 20 mil operários faleceram em decorrência da epidemia de febre amarela em 1881, levando a França a desistir da construção. Posteriormente, os Estados Unidos assumiram os trabalhos.

INTRODUÇÃO

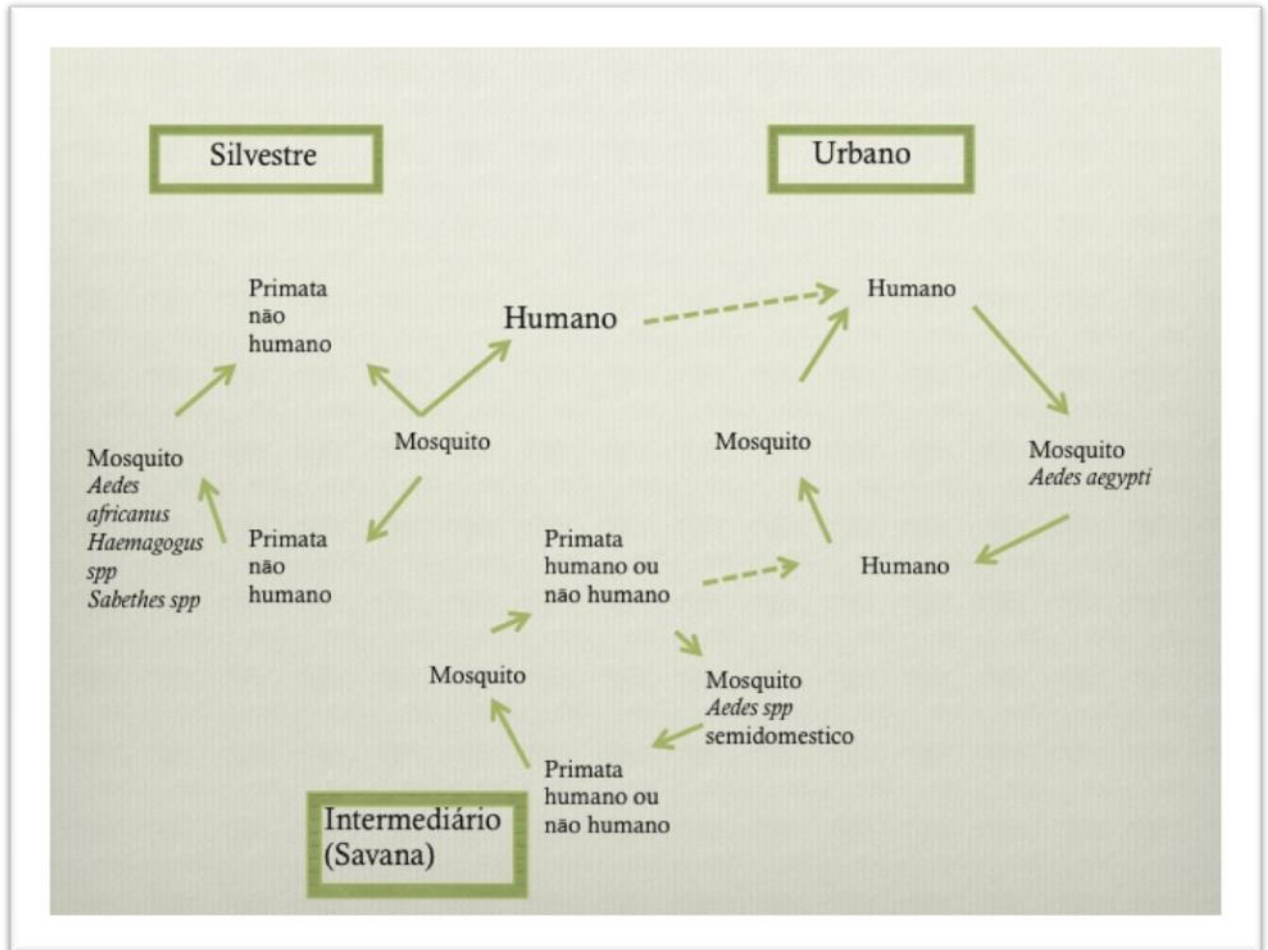
1.INTRODUÇÃO

A febre amarela (FA) é uma doença viral hemorrágica endêmica na América do Sul e África, com altas taxas de morbidade e letalidade. Cerca de 60000 pessoas morrem em decorrência da FA anualmente. [2, 3] É causada por um vírus da família *Flaviviridae*, que é composta por cerca de 70 vírus de RNA fita simples, entre eles o vírus da dengue, o vírus da encefalite japonesa e o West Nile vírus.[4, 5] A febre amarela é uma zoonose, transmitida por mosquitos hematófagos pertencentes, em sua maioria, ao gênero *Haemagogus* e *Aedes*. [4, 6] A primeira descrição da febre amarela é de 1648, entretanto estudos genéticos concluem que o vírus tem mais de 3000 anos e originou-se na África.[5, 7]

A FA é uma zoonose e apresenta um ciclo silvestre e um ciclo urbano. No ciclo silvestre, os hospedeiros são macacos e o homem é infectado esporadicamente, ao adentrar na floresta por atividades ocupacionais ou recreativas. [7, 8] O principal vetor do ciclo silvestre no Brasil é o *Haemagogus janthinomys* e secundariamente o mosquito do gênero *Sabethes*. [8] Os macacos mais afetados no Brasil são do gênero *Alouatta*, o macaco bugio, que geralmente sucumbem à infecção. [5]

No ciclo urbano, por sua vez, o homem é o hospedeiro final e os vetores são mosquitos *Aedes aegypti*, em sua maioria. [4] Ocorre quando um homem infectado na floresta retorna ao meio urbano. [9] Não há relatos de febre amarela urbana no Brasil desde 1942, apesar de continuar existindo no continente africano.[5][6] Na África, existe um ciclo intermediário, que ocorre na região das savanas, onde o homem e o macaco tornam-se infectados ao serem picados pelo *Aedes spp*, que nesta região comporta-se como mosquito semi-doméstico. [9][5] Os ciclos são ilustrados na figura 1. Durante o período da seca, o ciclo se mantém pela transmissão transovariana entre mosquitos. [7, 8, 10]

FIGURA 1. Os ciclos de transmissão da febre amarela: silvestre, urbano e intermediário.

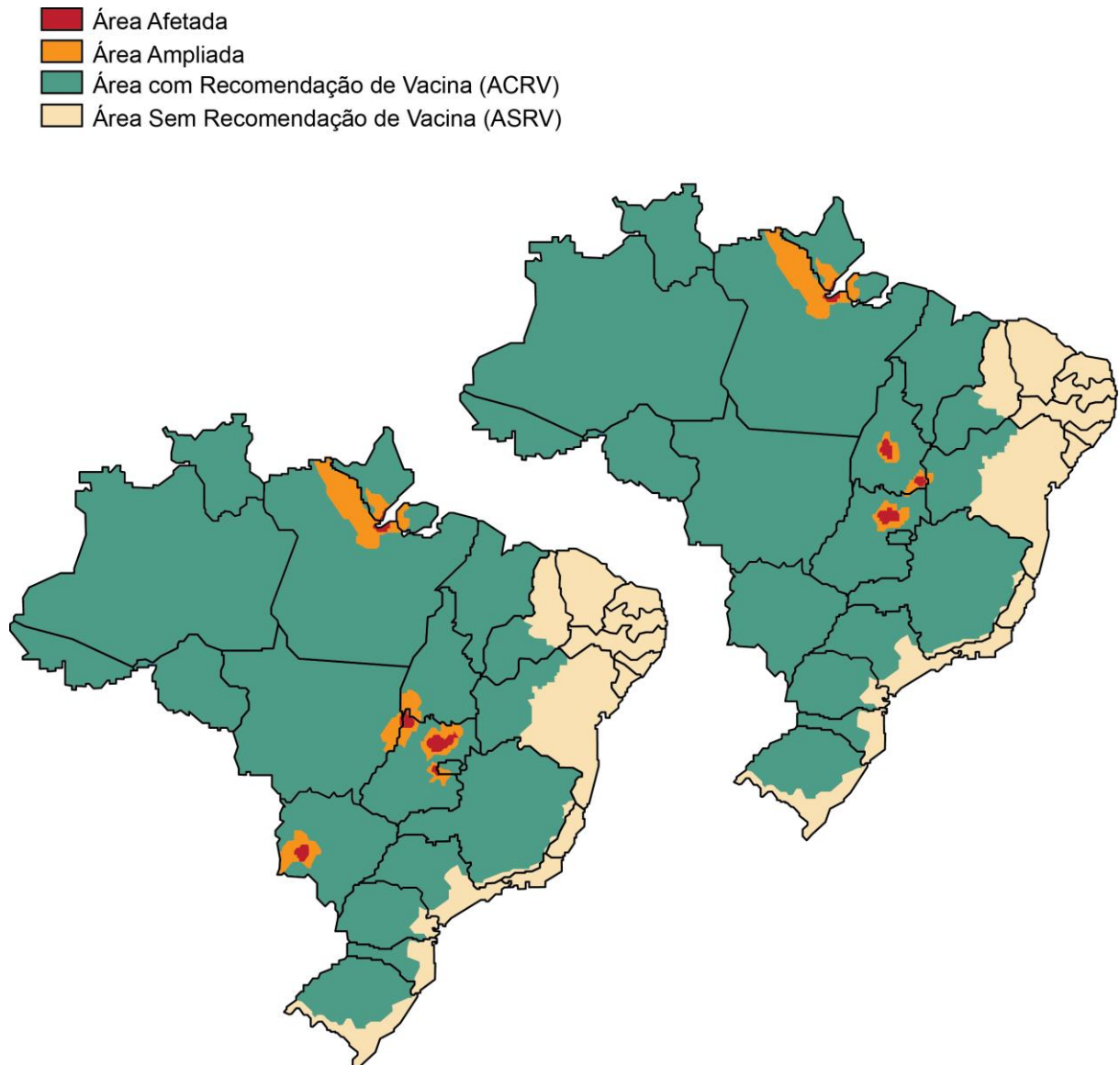


Fonte: Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em <https://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/index.html>. Adaptado e traduzido pela aluna.

A febre amarela dizimou milhares de pessoas entre os séculos XVIII e início do século XX, com grandes epidemias na América do Norte, Caribe e Europa. Devastou cidades inteiras e inclusive, enterrou as chances da França de construir o canal do Panamá, que viria a ser finalizado pelos Estados Unidos, após controle do vetor. [3]Carlos Finlay, epidemiologista cubano, descobriu que a FA era transmitida por mosquitos, em 1881. [10] Esse fato, aliado ao desenvolvimento de vacinas eficazes na década de 1930 possibilitou um controle maior da doença, apesar de ainda hoje ocorrerem epidemias em populações susceptíveis.

1.1 EPIDEMIOLOGIA

FIGURA 2. Casos humanos (A) e epizootias em primatas não humanos (B) confirmados para a febre amarela, Brasil, período de monitoramento 2014/2015



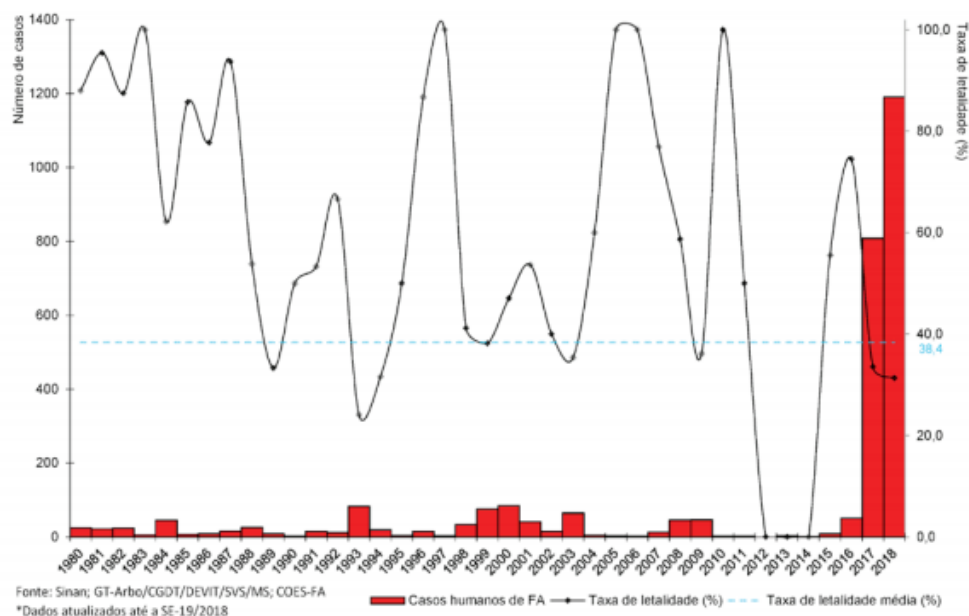
Fonte: Ministério da Saúde, Brasil. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil -2014/2015.
Arte: Luís Henrique Oliveira.

Em 2007 e 2009 houve uma epidemia no Brasil que avançou para áreas anteriormente classificadas como indenes, como São Paulo e Rio Grande do Sul, áreas com baixa prevalência de imunização. Nessa época mais de 100 casos humanos foram confirmados, com letalidade de 51%. [11] Estudos moleculares revelaram uma nova linhagem circulante do vírus amarelo, genótipo 1E, que evoluiu do genótipo 1D, predominante nos anos 90 no Brasil. [4] A figura 2 mostra as áreas de ocorrência de casos humanos e epizootias no período de monitoramento 2014/2015. Inicialmente, a transmissão ocorreu na região Norte, com posterior expansão no sentido leste e sul do país.[12]

O Brasil vivenciou em 2017 sua pior epidemia em décadas. Iniciou-se em dezembro de 2016. Entre janeiro e maio de 2017, 1392 casos de febre amarela foram reportados, sendo 729 casos confirmados. A taxa de letalidade é de 34,2%. [13, 14] Os principais estados brasileiros afetados foram Minas Gerais, com 708 casos, sendo 484 confirmados e 180 mortes; Espírito Santo com 518 casos (sendo 212 confirmados e 94 mortes e São Paulo com 54 casos, 17 confirmados e 7 mortes.[13] A figura 3 ilustra a série histórica dos casos humanos de FA e sua letalidade no Brasil de 1980 até junho de 2018.

Epidemias de febre amarela silvestre geralmente ocorrem com intervalos de 3-7 anos, coincidindo com o surgimento de grupos populacionais susceptíveis. [15] Dos casos reportados até fevereiro de 2017, 86% eram homens na faixa etária de 30-60 anos, residentes em áreas rurais, não vacinados. A disseminação do vírus ultrapassou os limites de regiões consideradas de risco e com indicação de vacinação. [15] Fatores que estão envolvidos na explosão dos casos de FA são: elevadas temperaturas e pluviosidade, alta densidade de vetores e hospedeiros primários e principalmente, presença de bolsões de susceptíveis e baixas coberturas vacinais.[16]

FIGURA 3. Série histórica do número de casos humanos confirmados para FA e sua letalidade, no Brasil, de 1980 a junho de 2018.



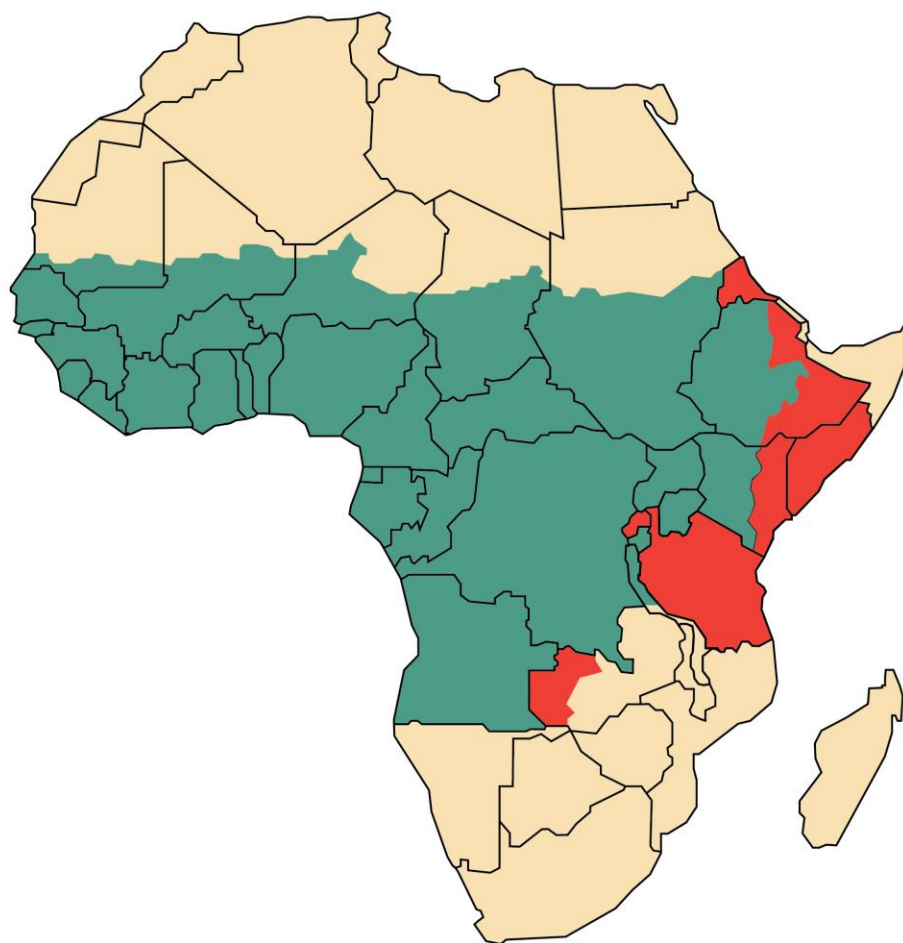
Fonte: Monitoramento do período sazonal da febre amarela – Brasil – 2018/2019- Ministério da Saúde. Acesso em: https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/17/informe-FA-n.2_12dez18.pdf

Com relação ao continente africano, a febre amarela é endêmica na região tropical e subtropical. A incidência anual é de cerca de 5000 casos[7], estatística provavelmente subestimada devido à subnotificação.[5] A África apresenta frequentes surtos epidêmicos, sendo os mais recentes em Uganda (2010), Sudão e Etiópia(2013), Angola (2015-2016) e mais recentemente, Nigéria (2017-2018).[2, 17-19]. A situação da Angola é preocupante e foi considerada um sério problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que contabilizou, até junho de 2016, 3137 casos (847 confirmados) e 350 mortes na Angola. [20] A figura 4 mostra as áreas com risco de transmissão de febre amarela na África. Falta de uma política de vacinação em massa, altas temperaturas e aumento dos índices pluviométricos são implicados como fatores propiciadores das epidemias. [4]

Não há relatos de febre amarela na Ásia, apesar de haver uma grande população de *A. aegypti* neste continente. Por isso é considerada uma área de risco, por conter uma massa de indivíduos não vacinados. Acredita-se que a proteção causada pela reação cruzada dos anticorpos contra a dengue ou a baixa competência do mosquito local sejam possíveis explicações para a ausência da febre amarela no continente asiático.[5, 7]

FIGURA 4. Áreas com risco de transmissão da febre amarela na África. Atualizado em julho de 2015.

- Área Geralmente Sem Recomendação de Vacina
- Área com Recomendação de Vacina (ACRV)
- Área Sem Recomendação de Vacina (ASRV)



Fonte: CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/africa.html>. Adaptado por Luís Henrique Oliveira.

Na África, existem 5 genótipos circulantes que variam de acordo com a região geográfica: África Ocidental I, África Ocidental II, África Oriental, África Centro-Oriental e Angola. [4]

Como a febre amarela é uma zoonose, não há como ser erradicada. Portanto, a principal forma de prevenção é a vacina. [20]

1.2 O VÍRUS DA FEBRE AMARELA

O agente causador da febre amarela é um vírus de RNA fita simples e é patógeno intracelular obrigatório.[7] Seu genoma contém 10233 nucleotídeos que codificam 3 proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais. [10]As proteínas estruturais são o envelope (E), a membrana (prM) e o capsídeo (C). Codificam a formação da estrutura básica do vírus.[6]A proteína E é um dos principais alvos da resposta imune, por ser responsável pela fase inicial de infecção celular. Os anticorpos neutralizantes respondem à proteína C do capsídeo. [6]

As proteínas não estruturais são NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Elas são responsáveis por atividades reguladoras e de expressão viral, tais como replicação, virulência e patogenicidade.[6]NS3 é o alvo das células T citotóxicas. Anticorpos contra NS1, por sua vez, ligam-se ao complemento com o objetivo de lise das células infectadas. [7] A tabela 1 abaixo descreve as proteínas virais e suas funções.

TABELA 1. Descrição das proteínas virais estruturais e não estruturais e suas funções.

| Proteína | Descrição | Funções |
|----------|---|--|
| C | Nucleocapsídeo viral | Formação do nucleocapsídeo viral induz a formação de anticorpos neutralizantes |
| prM | Proteína de membrana | Ligação e introdução do vírus na célula |
| E | Maior proteína do envelope. Antígeno inibidor da hemaglutinação (IH). | Montagem viral e receptor de ligação. Induz a formação de anticorpos IH |
| NS1 | Antígeno fixador do complemento | Maturação da partícula viral. |
| NS2A | Hidrofóbica | Provavelmente associada à maturação de NS1. |
| NS2B | Hidrofóbica | Possível componente da protease / replicase |
| NS3 | Altamente conservada | Multifuncional. Replicação do RNA |
| NS4A | Hidrofóbica | Possível componente da replicase |
| NS4B | Hidrofóbica | Possível componente da replicase |
| NS5 | Altamente conservada | Polimerase viral. Participa da replicação viral |

Adaptado de Vasconcelos PF, Febre amarela. Rev. Bras. Soc. Med. Tropical 2003, 36(2):275-293.

1.3 FISIOPATOLOGIA

O vírus amarelo é viscerotrópico e o fígado, os rins, o baço, linfonodos e coração são os órgãos mais acometidos. [4] A gravidade do dano hepático depende da viremia. Nos casos fatais observa-se intensa apoptose, com produção de TGF- β e citocinas antiinflamatórias que levam à morte celular e necrose. [4] A apoptose é predominante em relação à necrose, com a presença de corpos de Councilman (hepatócitos que sofreram degeneração eosinofílica) vistos ao exame histopatológico. [7] Este é um evento tardio, que ocorre 24h a 48 h antes do óbito. Na febre amarela, tanto as vias intrínsecas quanto extrínsecas da apoptose são envolvidas. Pela via intrínseca, metabólitos do estresse oxidativo são secretados pelo endotélio, o que promove lesões mitocondriais com liberação de membros da família Bcl2, que ao interagir com a cascata de caspases leva à apoptose. A via extrínseca, por sua vez,

ocorre pela ligação do Fas com receptor de TNF ou TRAIL (receptor ligante indutor de apoptose). Observa-se, também, necrose lítica dos hepatócitos com discreto infiltrado inflamatório de linfócitos e neutrófilos.[21]

Um padrão característico da febre amarela é o acometimento da região mediozonal hepática, com preservação da região portal e da veia central. Essas células provavelmente são mais sensíveis à replicação viral.[6, 10][21] A figura 5 mostra as lesões teciduais vistas ao histopatológico.

Figura 5. Lesões histopatológicas causadas pelo vírus amarelo .

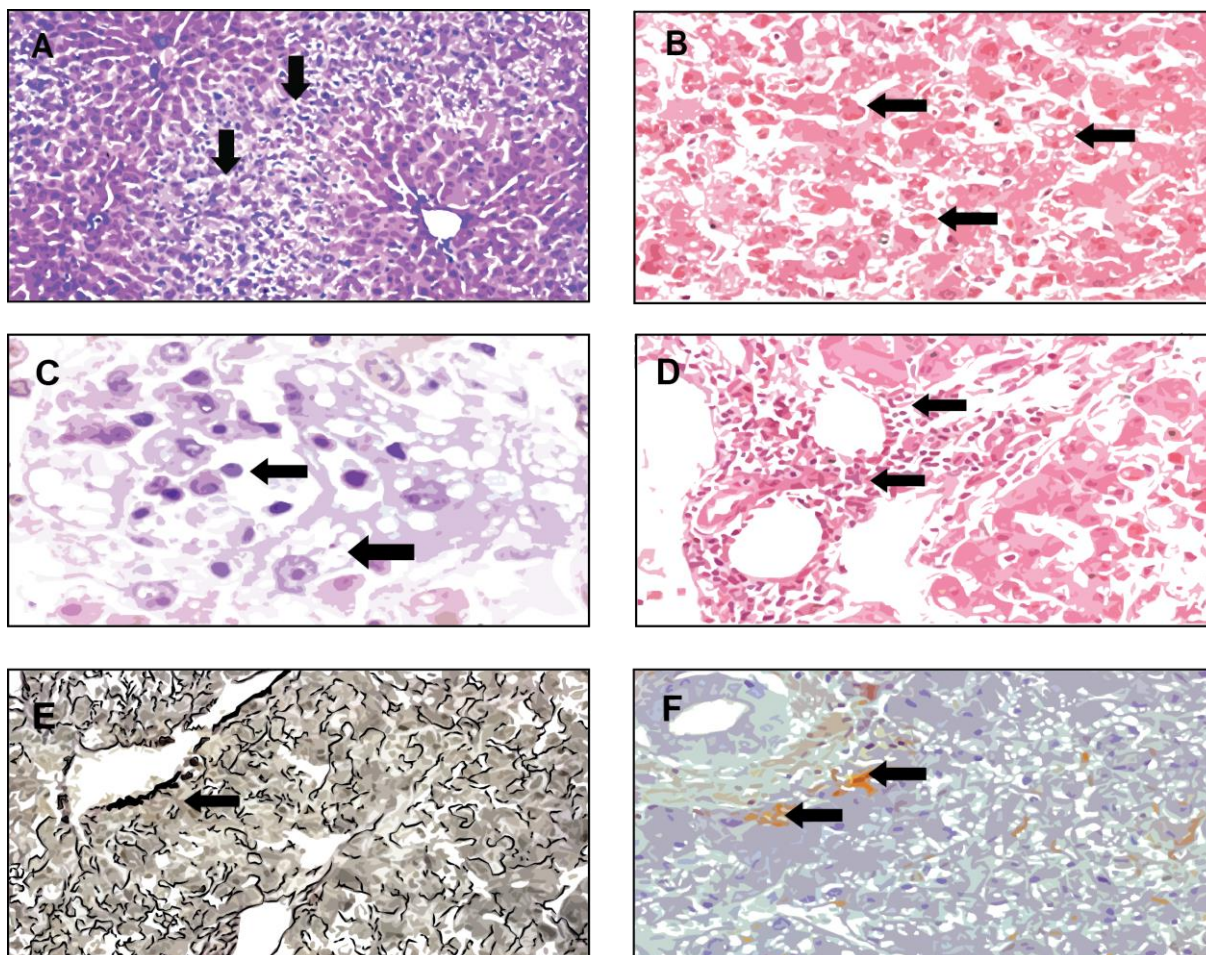


FIGURA 5. **A.** Acometimento mediozonal com preservação espaço periportal. Corado com hematoxilina-eosina. **B.** Presença dos corpos de Councilman (hepatócitos apoptóticos), corado com hematoxilina-eosina. **C.** Necrose lítica dos hepatócitos e esteatose microgoticular. **D.** Espaço portal com infiltrado inflamatório composto por células mononucleares. **E.** Ausência de tecido fibrotico com manutenção da arquitetura hepática. **F.** Imunohistoquímica mostrando a presença do antígeno no espaço portal.

Fonte: 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. Rev Med. Virol. 2013; 23:305-318. Adaptado por Luís Henrique Oliveira.

No rim, observam-se degeneração gordurosa e eosinofílica do epitélio tubular, com mínima inflamação. [7] A albuminúria é causada por disfunção glomerular, haja vista a presença do antígeno viral em glomérulos de macacos 2-3 dias após a infecção.

1.4 RESPOSTA IMUNE AO VÍRUS AMARÍLICO

O vírus amarelo é inicialmente reconhecido pelas células dendríticas e levado aos linfonodos, onde é apresentado aos linfócitos CD4⁺. [21] A resposta imune ao vírus é

predominantemente Th1, com expressão de IL-6, citocina pró-inflamatória. Os infiltrados inflamatórios são compostos de células CD4⁺, CD8⁺, células NK e são vistos com mais frequência na região portal e mediozonal hepática. [4]

A resposta humoral surge na primeira semana com anticorpos IgM, chegam ao pico na segunda semana e declinam ao longo de vários meses. Os anticorpos neutralizantes, principal proteção contra a reinfecção, aparecem ao fim da primeira semana e duram décadas.[7]

1.5 QUADRO CLÍNICO DA FA

A FA é uma doença febril aguda, que se manifesta com náuseas, vômitos, dor epigástrica, icterícia, dano miocárdico, falência hepática e renal com posterior choque e hemorragias.[7, 10] O período de incubação é de 3-6 dias. [6, 7]. A viremia atinge o pico 2-3 dias após a infecção. [22]A taxa de letalidade varia de 20-60%, sendo maior na América do Sul do que na África. Isso provavelmente se deve a fatores genéticos. Observa-se que caucasianos apresentam maiores taxas de anticorpos neutralizantes após a vacinação do que afro-americanos.[4]

A gravidade dos sintomas é variável, desde casos assintomáticos até casos fatais. A relação de casos inaparentes sobre sintomáticos é de 7-12:1. [4] A doença inicia-se com sintomas inespecíficos como febre, calafrios, cefaleia, mialgia, náuseas e tonturas. O sinal de Faget (bradicardia em presença de febre) pode ser notado ao exame físico. [7]A viremia, neste momento, pode chegar a $10^5 - 10^6$ partículas virais por mililitro. Leucopenia com relativa neutropenia é comumente encontrado.[10]

O acometimento hepático correlaciona-se com a gravidade da infecção, sendo que níveis de alanina aminotransferase (TGP) superiores a 1200 UI ou aspartato aminotransferase (TGO) acima de 1500 apresentam prognóstico sombrio. [4, 22]As enzimas hepáticas elevam-se após 48-72 h do início da febre, denominado período de infecção. [7] Após alguns dias de febre, há o período de remissão, em que os sintomas cessam. Este período pode durar 24h. O indivíduo pode se curar ou evoluir para o período de intoxicação (15-25% dos casos). [7]Neste momento há um agravamento dos sintomas, com piora da icterícia, elevação de transaminases e hiperbilirrubinemia direta. Contudo, nem sempre se consegue distinguir essas fases da doença. [6]

A insuficiência hepática leva à redução da produção de fatores de coagulação culminando na diátese hemorrágica, visto nos momentos finais da febre amarela.

Plaquetopenia, aumento do tempo de protrombina, hipofibrinogenemia, e baixos níveis de fatores II, V, VII, VIII, IX e X são encontrados. [6, 7]

A insuficiência renal em decorrência de necrose tubular aguda, com azotemia, albuminúria, anúria também é um marcador de gravidade da doença. Nos casos fatais, há uma evolução para choque hipovolêmico e falência múltipla de órgãos. O óbito ocorre geralmente dentro de 7-10 dias decorrente de insuficiência hepato-renal ou hemorragias volumosas. A fase de convalescença, naqueles que sobrevivem, dura várias semanas e cursa com fadiga e astenia.[6, 7]

O diagnóstico diferencial da FA abrange febres hemorrágicas, principalmente leptospirose, assim como hepatites virais, malária e dengue. [6]

1.6 DIAGNÓSTICO DA FA

O diagnóstico sorológico da FA geralmente é feito por meio do IgM- Elisa, porém este exame possui reação cruzada com outros flavivírus, como o vírus da dengue. [4] Além disso, o IgM não necessariamente significa infecção recente, pois pode perdurar por anos após a infecção ou mesmo após a vacinação. [23] Entretanto, o aumento progressivo nos títulos de IgM em dosagens pareadas fortalece o diagnóstico. [7] O RT-PCR quantitativo apresenta alta sensibilidade e especificidade. A detecção do antígeno NS1 nas fases iniciais, por sua vez, também apresenta boa sensibilidade e especificidade, sendo um método rápido e que pode diagnosticar a FA no estágio inicial. [4]

O isolamento do vírus amarelo realizado em amostras biológicas é feito em cultivo celular (células VERO, clone C6/36) ou em camundongos recém-nascidos. A replicação viral ocorre do 5^o ao 7^o dia de cultura e o vírus é identificado por meio de imunofluorescência indireta ou teste de fixação do complemento. [6]

1.7 TRATAMENTO DA FA

Não existe tratamento antiviral específico para FA.[7] Em modelos experimentais, o interferon- gama teria alguma ação se aplicado em 24h do início da infecção. [4] Nesse caso seria eficaz na profilaxia pós-exposição por acidente de trabalho de funcionários de laboratório, por exemplo. [10] A ribavirina mostrou eficácia antiviral in vitro, porém testes em animais não foram promissores.[4]

O tratamento geralmente é realizado em unidades de tratamento intensivo e é paliativo. Recomenda-se nutrição adequada, reposição hídrica vigorosa, drogas vasoativas, ventilação mecânica, antibióticos em caso de infecção secundária. Na insuficiência renal, a hemodiálise faz-se necessária. Plasma fresco congelado é utilizado no tratamento da coagulação intravascular disseminada. [6, 7]

Recentemente, no Brasil, foi realizado transplante hepático em doentes com febre amarela que desenvolveram falência hepática aguda. Foram relatados 30 transplantes, porém apenas 20% sobreviveu, devido a gravidade dos casos. [24]

1.8 A VACINA DA FEBRE AMARELA

A vacina da febre amarela (VFA) é uma vacina de vírus vivo, sendo considerada uma das mais eficazes vacinas já produzidas, com cerca de mais de 600 milhões de doses aplicadas. [25] Foi descoberta por Max Theiler e colegas em 1937 a partir do isolamento viral de um paciente africano que se curou, chamado Asibi. [5, 26, 27] Theiler submeteu o vírus a 176 passagens em culturas celulares de ratos e galinhas, o que levou à atenuação viral, apesar de manter sua imunogenicidade. [26, 28-30] Esta cepa original recebeu a designação de 17D.

A vacina neurotrópica francesa foi desenvolvida no mesmo período, porém com outro espécime viral atenuado, isolado em Dakar. Foi bastante utilizada na África, na década de 60, com drástica redução dos casos de febre amarela. Entretanto foi abandonada por seu neurotropismo e diversos casos de encefalite em crianças. [26, 31, 32]

Em 1940 a Organização Mundial de Saúde criou um sistema de lotes de sementes a fim de evitar variações imunogenéticas no vírus vacinal, o que poderia comprometer a segurança da vacina. Os lotes de sementes consistem na preparação e estoque de uma grande quantidade de vírus, que são testados quanto à manutenção do código genético e são utilizados na produção atual de vacinas. [33].

Da cepa original 17D, originaram-se as subcepas 17D-204 e 17DD, que são utilizadas para a produção atual de vacinas contra a febre amarela. [31, 34] A vacina 17DD é utilizada na América do Sul e é produzida por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. [25, 35] A vacina 17D-204 é produzida na França, Rússia, Senegal. As subcepas 17D-204 e 17DD apresentam diferenças sutis na composição dos oligonucleotídeos, o que possivelmente pode acarretar variações na imunogenicidade e reatogenicidade. [34] Cerca de 99,9% da sequência de ácidos nucleicos é semelhante em ambas. [30] A subcepa 17D-204 é produzida após 235-240 passagens em tecidos celulares, enquanto a 17DD é submetida a 287-289 passagens. Da vacina 17D-204 originou-se a vacina 17D-213 que atualmente está na 240ª passagem. [30]

Em 1951, Max Theiler ganhou o Premio Nobel de Medicina,[25, 27] por essa descoberta que salvou e continua salvando incontáveis vidas.

1.8.1 Eventos adversos pós-vacinação (EAPV)

EAPV é qualquer evento indesejado ou não intencional após a vacinação e que, não necessariamente, possui uma relação causal com a vacina.[36] Os EAPV classificam-se em reações locais e sistêmicas, podendo ser leves, moderados ou graves. A vacina 17D-204 é bastante segura e eventos adversos graves são raros (1 a cada 250000 ou 500000).[25]

Quanto às reações locais, o sintoma mais relatado é dor no local da aplicação, cerca de 4% dos casos. Geralmente é autolimitado e de curta duração. [36] As manifestações sistêmicas incluem febre, cefaleia e mialgia, que ocorrem em aproximadamente 4% dos primovacinados. Reações de hipersensibilidade como rash, urticária, asma e anafilaxia ocorrem em uma frequência menor. No Brasil, a taxa de anafilaxia foi de 0,023 casos por 100 mil doses aplicadas.[36]

Em relação aos eventos adversos graves associados à VFA (EAG-VFA), encontram-se a reação de hipersensibilidade, a doença viscerotrópica e a doença neurológica associada à vacina antiamarílica. No Brasil, de 2007 a 2012, a incidência de EAG-VFA foi de 0,42 casos por 100 mil doses. [36]

A doença viscerotrópica aguda associada à VFA (DVA-VFA) consiste em um quadro clínico bastante semelhante à febre amarela, com falência de múltiplos órgãos e alta letalidade (cerca de 60%). Foi descrita a partir de 2001 e a incidência é de 0,4 a cada 100000 doses. Em indivíduos acima de 60 anos, a estimativa é que seja 4 vezes maior.[37]

A doença neurológica aguda associada à VFA (DNA-VFA) caracteriza-se por meningoencefalite (invasão do sistema nervoso central pelo vírus vacinal) ou manifestação autoimune como a síndrome de Guillain–Barré. No Brasil, a incidência de casos de DNA-VFA foi de 0,2 casos por 100 mil doses aplicadas, no período de 2007 a 2012. [36]

A explicação mais provável para esses eventos adversos é a susceptibilidade genética individual, já que não foram encontradas mutações no vírus vacinal.[25, 38] Já foram reportados casos de DVA-VFA em timectomizados e polimorfismos nos genes OAS 1 e OAS 2 e no eixo CCR5-RANTES. [38] Dos 26 indivíduos relatados com DVA-VFA, 15% apresentavam doença do timo, como timoma ou miastenia gravis. [22] O principal defeito parece se concentrar na imunidade inata, já que em todos os casos os indivíduos apresentaram altos títulos de anticorpos neutralizantes e uma robusta resposta celular.

Pulendran e colaboradores relataram o caso de um homem de 64 anos que desenvolveu DVA-VFA dois dias após receber a vacina 17D-204. A análise do soro mostrou que o RNA viral foi detectado até 33 dias pós-vacinação, sendo que o clearance viral em indivíduos saudáveis ocorre em 7 dias, em média. A persistência do RNA viral não se deveu a alterações na resposta adaptativa, que foi bastante consistente. Nesse caso havia um polimorfismo no receptor de quimiocina CCR5 e seu ligante RANTES, que são responsáveis pela migração de células T efetoras e monócitos CD14⁺CD16^{bright} para os tecidos, o que pode ter comprometido a resposta imune inata. [39]

Silva e colaboradores estudaram o soro de uma jovem de 23 anos, que apresentou DNA-VFA após vacinação com 17D-204.[40] No 8º dia pós-vacinação, a paciente evoluiu com encefalite, rabdomiólise e hepatite. A análise de células polimorfonucleares no sangue periférico foi comparada com voluntários saudáveis. A paciente em questão apresentava maior taxa de células NK e menor expressão de Fc-γr em monócitos (os receptores de Fc ligam-se às imunoglobulinas para ativar as ações de endocitose e fagocitose). Além disso havia uma taxa maior de células TCD4 ativadas e baixa proporção de células T regulatórias. [40]. As células B, por sua vez, também se encontravam mais ativadas quando comparadas à voluntários saudáveis, porém com redução de expressão de CXCR3 em linfócitos TCD4 e TCD8. O padrão pró-inflamatório também se manifestou na produção de citocinas, com aumento de IL-12 e TNFα e baixa de IL-10, IL-4 e IL-5. Esses achados corroboram a hipótese de alterações na imunidade inata ser a causa de eventos adversos graves à vacina da febre amarela.[40]

Um estudo randomizado, controlado com placebo comparou a reatogenicidade da vacina 17D-213/77 com dois lotes de sementes da vacina 17DD[33]. Mil e oitenta e sete voluntários foram vacinados e observados durante 30 dias para análise de viremia e mensuração de enzimas hepáticas. Não houve eventos adversos graves. O evento adverso mais comum foi dor no local da injeção, sem diferenças entre os grupos. Febre, mialgia e cefaleia também ocorreram, com frequências semelhantes entre os grupos. A taxa de eventos adversos variou de 17,8 a 21,7% no grupo de vacinas e 14,3% no grupo placebo. [33].

1.8.2 Alterações imunológicas induzidas pela vacina anti-amarela

A vacina contra a febre amarela reproduz uma infecção viral aguda e induz uma potente resposta humoral e celular de longa duração.[25] A seguir descreveremos as respostas

da imunidade celular inata, adaptativa e humoral das vacinas da febre amarela e sua ação em grupos de indivíduos específicos: idosos, crianças e imunossuprimidos.

1.8.2.1 Resposta celular inata induzida pela vacinação antiamarílica

A imunidade inata é responsável por controlar inicialmente a infecção pelo vírus amarílico e induzir uma resposta imune celular com formação de células de memória. [41]

A vacina 17D-204 estimula a resposta inata por meio de diversos receptores do tipo Toll (TLR), culminando na ativação de células dendríticas mielóides e plasmacitóides.[25, 31]Os TLR envolvidos são TLR 2, 9, 7, 8 e 3. Os receptores MDA 5 e RIG-I, que reconhecem moléculas de RNA, também são ativados. [32, 42]

A ativação da resposta imune inata é fundamental para gerar uma resposta antígeno-específica celular com produção de $IFN\gamma$. A ativação de diferentes TLR, por sua vez, promove a modulação de centros germinativos e formação de células B de memória, já que os TLR também são expressos por células B presentes nos centros germinativos.[25]

Martins e colaboradores estudaram 10 indivíduos saudáveis que se primovacinaaram com 17DD. Observou-se ativação de neutrófilos com aumento de expressão de CD28 e CD23 nos dias 7 e dias 15 pós-vacinação. Eosinófilos também foram ativados com aumento da expressão de CD28 e HLA-DR no 30º dia pós-vacinação. No dia 7, houve aumento da frequência de monócitos ativados ($CD14^+CD16^{high}$) e monócitos pró-inflamatórios ($CD14^+CD16^+HLA-DR^+$). As células natural killer (NK) sofrem um decréscimo no dia 7, provavelmente um efeito regulatório, que também se manifesta no aumento da expressão de IL-10R em grande parte dos componentes da imunidade inata nos dias 15 e 30.[41] Na imunidade inata, os fenômenos de ativação e modulação do sistema imune ocorrem simultaneamente, haja vista a correlação positiva entre os níveis de neutrófilos CD28 e expressão de IL-10R. [41]

As células NK, por sua vez, possuem um papel central na fase inicial de resposta ao antígeno vacinal ao controlar a viremia e agir na maturação das células dendríticas.[42]. Estas células são responsáveis pelo aumento da expressão de TLR 3 e 9 na presença de IL-12. Além disso, após contato com a vacina 17DD, há um aumento na expressão de CD38 e CD16 na superfície das células NK, o que caracteriza desdobraamento da atividade citotóxica. [42]

Com relação à vacina 17D-204, de maneira semelhante, foi encontrado aumento percentual no 7º dia pós-vacinação de CDs mielóides $CD86^+$, CDs plasmacitóides e monócitos inflamatórios $CD14^+CD16^+$ [43], com aumento da produção de IP-10 e IL-1 β .

Além disso, a vacina 17D-204 promove indução de uma rede de genes que medeiam uma resposta antiviral pró-inflamatória.[25]

Os linfócitos gama delta ($\gamma\delta$) são um subtipo de células T que possuem um receptor (TCR) com uma cadeia gama e uma delta, diferente da maioria das células T, que possuem cadeia alfa e beta. Essa variação permite uma ação tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, pois o reconhecimento de antígenos independe do MHC, e leva a um rápido reconhecimento de células infectadas e produção de citocinas. [44]. Após a imunização com a vacina 17D-204, os linfócitos $\gamma\delta$ são as primeiras células a produzir $\text{IFN}\gamma$, seguidos pelos linfócitos TCD4^+ e TCD8^+ . [45, 46] A liberação de $\text{IFN}\gamma$ influencia a maturação de células dendríticas e a polarização de linfócitos TCD4^+ para a resposta tipo 1. [46]

Além disso, a vacina 17D-204 ativa o inflamassoma, um complexo multiprotéico responsável por favorecer a maturação da $\text{IL1}\beta$ e IL-18 e por induzir piroptose. As células dendríticas após contato com o vírus vacinal aumentam em até 9x a produção de $\text{IL1}\beta$, [47] que é capaz de regular a ativação das células T helper, a proliferação de células B e produção de imunoglobulinas. [32]

1.8.2.2 Resposta celular adaptativa induzida pela vacinação antiamarílica

1.8.2.2.1 Células TCD4^+ e TCD8^+

Após a vacinação com 17DD, a viremia atinge o pico no dia 5, com redução gradativa até dia 7. [11, 48] Com relação à população de células T, a vacina 17DD induz a um decréscimo da subpopulação de células $\text{TCD8}^+\text{CD62L}^+$ no 7º dia pós-vacinação. Martins e colaboradores analisaram células polimorfonucleares do sangue periférico (PBMC) de primovacinados e perceberam perfis distintos entre as células TCD4^+ e TCD8^+ . No 7º dia pós-vacinação, as células TCD8^+ exibiram marcadores precoces de ativação (CD69^+), enquanto as células TCD4^+ exibiram marcadores tardios de ativação (HLA-DR), que se mantêm em alta proporção até o 30º dia. As células TCD8^+ foram ativadas tardiamente quando comparadas às células TCD4^+ , [49] e houve uma frequência reduzida de células CD38^+ no 30º dia pós-vacinação, o que pode ser justificado pelo aumento da expressão de IL-10R no 15º dia em células TCD4^+ e TCD8^+ . [49] A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e a proliferação de células T. [50]

Santos e colaboradores estudaram um grupo de oito indivíduos que foram imunizados com a vacina 17DD pela primeira vez e 9 indivíduos revacinados. Foi demonstrado um aumento na frequência de células $\text{TCD8}^+\text{CD38}^+$ (marcador de ativação) em todos os

voluntários. Os revacinados apresentaram maior percentagem de células TCD4⁺CD45RO⁺ e TCD8⁺CD45RO⁺ em relação ao grupo de indivíduos primovacinados, o que sugere uma resposta imunológica celular mais rápida após a revacinação. [51]

Os eventos de ativação e modulação do sistema imune gerados pela vacinação anti-marijuana ocorrem de forma simultânea. No 7º dia pós-vacinação, há uma correlação positiva entre células TCD4⁺HLA-DR⁺ e TCD4⁺CD25^{high} regulatórias. As células TCD4⁺CD25^{high} regulatórias produzem IL-10 e TGF α, citocinas anti-inflamatórias. [49]

De forma semelhante, a vacina 17D-204 induz uma rápida expressão de células T CD8⁺ Ki-67⁺, o que promove a downregulation de bcl-2, favorecendo a apoptose.[25, 47] Há uma grande proliferação de células T CD8⁺ nos 15 dias pós-vacina, com expressão de HLA-DR e CD38⁺ (diferenciação em células efetoras), representando 2-13% de todas as células T CD8⁺[52]. No 30º dia pós-vacina, há perda do fenótipo efetor, com redução da expressão de Ki-67 e transformação em células de memória, com expressão de Bcl-2, CD127 e CD45RA. As células CD8⁺ de memória classificam-se pela expressão de CD45RA e CCR7 em células centrais de memória (CD45RA⁻ CCR7⁺), efetoras de memória (CD45RA⁻CCR7⁻) e células efetoras terminalmente diferenciadas (CD45RA⁺ CCR7⁻). A maior parte das células TCD8 de memória é do tipo CD45RA⁺ CCR7⁻, que normalmente possuem baixo potencial proliferativo. Entretanto, as células TCD8 específicas para o vírus vacinal apresentam alta capacidade de multiplicação. [52-54]. Blom e colaboradores analisaram 21 indivíduos vacinados com 17D-204 a fim de avaliar a cinética das células TCD8, e perceberam que houve uma transição de células CD45RA⁻PD-1⁺ efetoras para CD45RA⁺PD-1⁻ de memória (PD-1 é um marcador de superfície que induz apoptose). Essa transição ocorre gradativamente do dia 15 ao dia 90 pós-vacinação[48, 55]. As células TCD8⁺ apresentam uma resposta ampla e complexa a vários epítopos, sendo o mais comum o HLA-A2-restrito NS4b (proteína não estrutural presente no RNA viral). [55, 56] Com isso, existe uma correlação entre a magnitude da ativação de células TCD8⁺ com a carga viral, ou seja, quanto maior a carga viral, maior a intensidade de células TCD8⁺ efetoras, até um nível de saturação.[48]

As células TCD8⁺ possuem várias funções desde ação citotóxica direta como secreção de citocinas antivirais (IFNγ, TNFα, IL-2, proteína 1β inflamatória do macrófago).[52] A ação citotóxica direta ocorre pelas moléculas de perforina e granzima A e B. Estas células adquirem um potencial citotóxico a partir do dia 12 e se mantêm por até 6 meses pós-vacinação. [56] Além disso, uma única dose da vacina é capaz de gerar células TCD8⁺ de memória por 5-10 anos, independente da reexposição a antígenos virais. [54]

Corroborando com os achados de Akondy (2009), Campi-Azevedo e colaboradores demonstraram um aumento significativo de células T efetoras em voluntários 30-45 dias após a vacinação primária com a vacina 17DD quando comparados a indivíduos não vacinados. Entretanto, nos voluntários 10-11 anos pós-vacinação, observou-se uma diminuição dos níveis de TNF α e IFN γ em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e aumento de linfócitos TCD4 IL-10⁺. Sugerindo a necessidade de revacinação após 10 anos da vacinação primária .[57]

Na vacina 17D-204, as células TCD4 inicialmente diminuem, relacionadas ao pico de viremia, entretanto aumentam na segunda semana. [58, 59]. A ativação das células TCD4⁺ e T reguladoras (Treg) precedem a ativação das células TCD8⁺. [55] Estas células TCD4 são predominantemente CD45RA⁻CXC3⁺ secretoras de IFN[60] e apresentam uma robusta expansão no 14º dia pós-vacinação. Após 1 mês, há a transição do fenótipo efector para memória central.[60]

1.8.2.2 Células B

Em relação à imunidade celular provocada pela vacina 17DD, estudos mostram um equilíbrio entre ativação e modulação. Linfócitos B CD19⁺ encontram-se bastante diminuídos no 7º dia pós-vacinação antiamarílica, o que leva a uma proporção maior de células T nesse período.[49] No 15º dia pós-vacinação, há um aumento de células B de ativação precoce (células CD19⁺CD69⁺) e aumento da expressão do receptor de IL10 (IL10R), o que favorece a proliferação e maturação de células B.[49] Por outro lado, também há marcadores de regulação como aumento da expressão de CD32 e redução do percentil de células CD19⁺CD23⁺. CD32 é um receptor de membrana que inibe a produção de anticorpos em presença de IgG. [49]. Campi-Azevedo e colaboradores também demonstraram em voluntários, 30-45 dias pós primovacinação com a vacina antiamarílica 17DD, um aumento significativo de linfócitos B clássicos em relação aos indivíduos não vacinados.[57]

Em relação à vacina 17D, Kohler e colaboradores demonstraram uma redução do número de células B no dia 7 com subsequente aumento até o dia 14 e, após este tempo, um gradativo retorno aos níveis pré-vacinais. [59]

1.8.2.3 Resposta humoral induzida pela vacinação antiamarílica

A vacinação com 17D-204 produz anticorpos neutralizantes que chegam a durar 30-40 anos [25, 31, 56, 61, 62]. Anticorpos IgM surgem a partir do dia 7, alcançam o pico após 2

semanas e logo após há o surgimento dos anticorpos neutralizantes. [56]. Contudo, os anticorpos IgM podem ser encontrados até 3-4 anos pós-vacinação[23]e as taxas de soroconversão variam de 89,7 a 98,2%. [62, 63]

Os anticorpos conferem proteção por vários mecanismos dentre os quais citam-se: citotoxicidade direta, lise de células infectadas pela via do complemento, inibição da fusão viral, neutralização da ligação do vírus ao receptor celular e clearance viral dependente da ligação Fc-γreceptor.[64]

Anticorpos neutralizantes são capazes de neutralizar a partícula viral, impedindo sua entrada na célula. São considerados o principal mecanismo imunológico de defesa e respondem a epítomos da superfície viral. [63] Surgem a partir do sexto dia após a vacinação, com pico em 2 semanas.[65] O PRNT é o teste padrão-ouro para titulação dos anticorpos neutralizantes, ao passo que o ELISA detecta o total de anticorpos neutralizantes e não neutralizantes. Foi desenvolvido a partir de estudos de dose-resposta em macacos Rhesus, em que se evidenciou que o \log_{10} índice de neutralização $>0,7$ era considerado protetor.[62]

Em relação à vacina 17DD, Melo e colaboradores estudaram 238 voluntários sadios que se primovacinaaram contra a febre amarela. 100% dos indivíduos desenvolveram uma resposta humoral protetora, com títulos do teste de neutralização por redução de placas (PRNT) $\geq 1:20$. [30] Melo e colaboradores também dosaram os títulos de PRNT em indivíduos que já haviam sido vacinados há 5 e 10 anos. Observou-se um decréscimo de 83% e 87%, respectivamente, nos níveis de PRNT em comparação a recém-vacinados. [30]

Reinhardt e colaboradores detectaram, em todos os voluntários submetidos à vacinação com 17D-204, anticorpos neutralizantes na segunda semana após a vacinação, com título médio de 1:88. Após 10 anos, os títulos de anticorpos decresceram 18%. [58]

Camacho e colaboradores publicaram um estudo randomizado, duplo-cego, controlado com placebo comparando as vacinas 17D-204 e 17DD. Foram recrutados 1087 voluntários e as taxas de soroconversão foram equivalentes em cerca de 98% dos participantes. A média e a mediana dos títulos de anticorpos também foi semelhante entre as vacinas. [66]

As figuras 6 e 7 ilustram as alterações imunológicas que ocorrem após a vacinação com 17DD.

1.8.2.4 Citocinas e quimiocinas

A produção de citocinas ocorre de forma precoce e robusta no 5º ao 7º dia pós-vacinação com a vacina 17DD. Concomitante com o pico de viremia, há o pico das citocinas pró-inflamatórias IFN γ e TNF α e IL-2. [35] As citocinas regulatórias por sua vez, aumentam

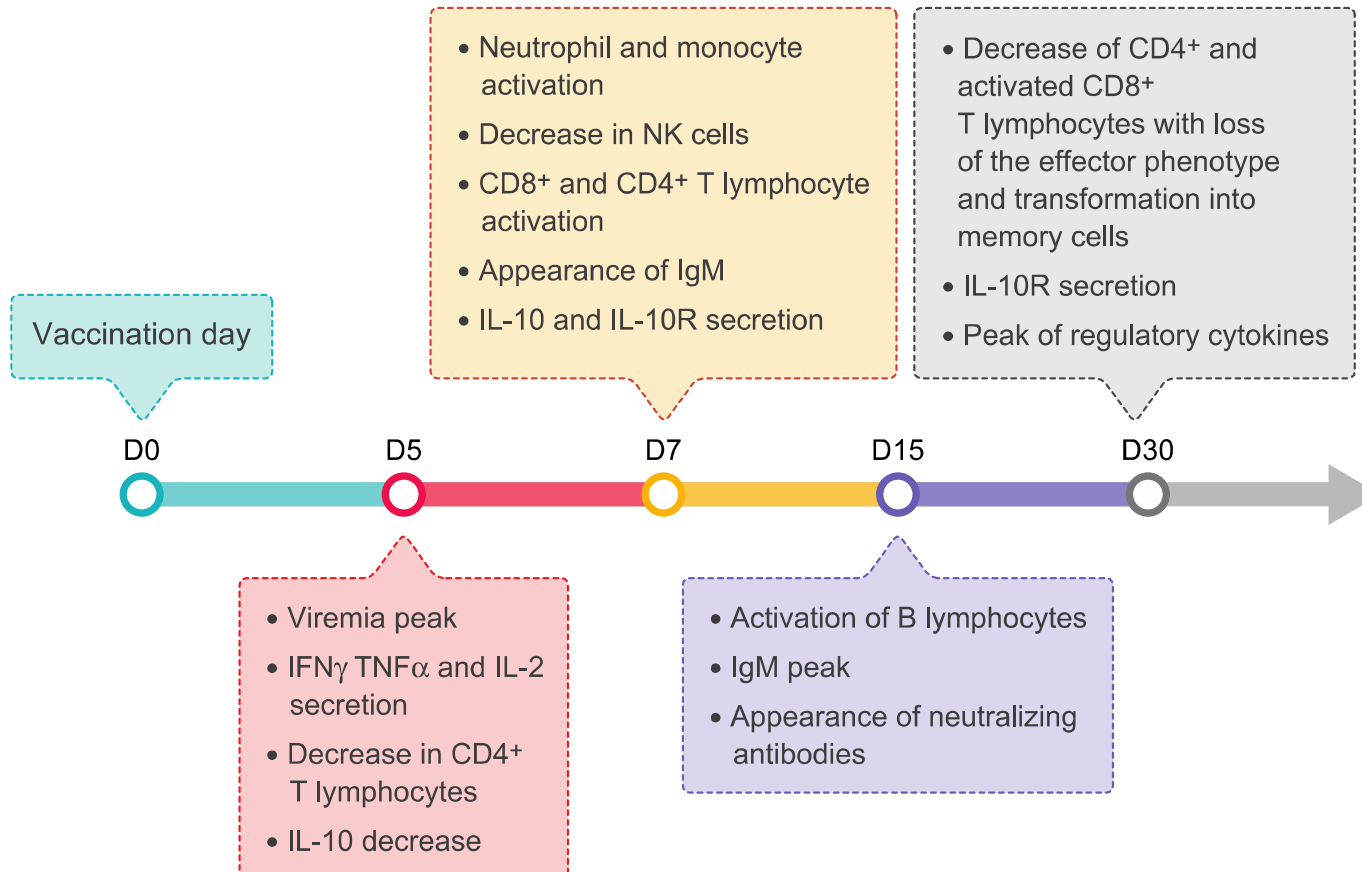
gradativamente com pico no dia 30 (IL-4 e IL-5), à exceção da IL-10, que tem aumento precoce no dia 3, um decréscimo no dia 5 e volta a subir entre os dias 6 e 7. A queda de IL-10 no pico de viremia permite o desenvolvimento e maturação das células apresentadoras de antígenos e uma maior expressão de MHC. [35]

Querec e colaboradores estudaram as alterações precoces de citocinas em 15 indivíduos vacinados com a vacina 17D-204 nos dias 0 até 21 pós-vacinação. Foi observado aumento significativo da quimiocina IP10 (CXCL10) E IL-1 α em todos os períodos.[43]

Segundo Martins e colaboradores, no 15º dia pós-vacinação com a vacina 17DD, as células TCD4⁺e TCD8⁺ apresentam expressão aumentada de CXCR3 [49], um receptor de quimiocina que atua na resposta tipo 1 principalmente no recrutamento de células T.[67] Entretanto, no 30º dia pós-vacinação, o aumento da expressão de CCR2 tanto por células TCD4⁺ e TCD8⁺ caracteriza uma resposta Th0, com um padrão misto de citocinas. [49] Esse padrão é persistente, tendo sido encontrado até 1 ano após a vacinação. [47]

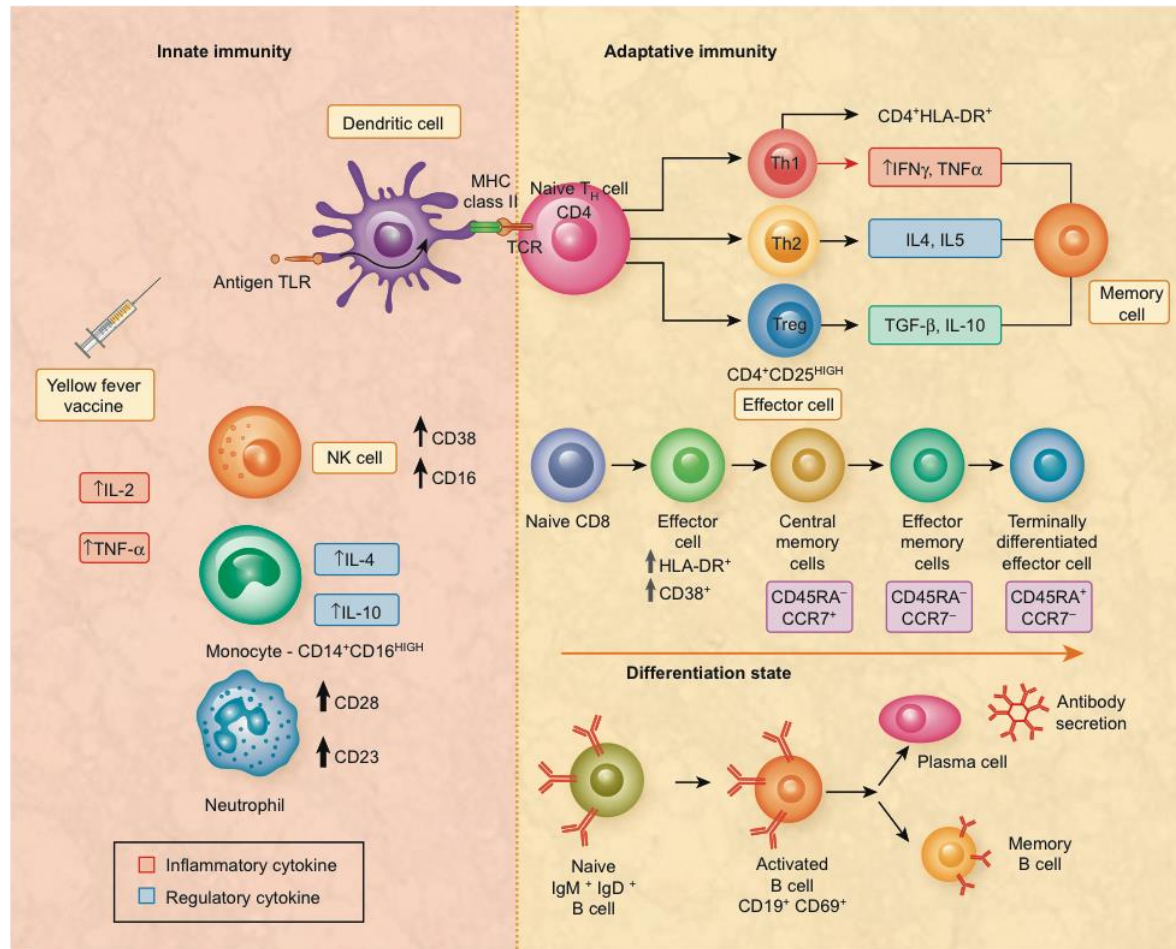
As células da imunidade inata, por sua vez, também apresentam um padrão misto de citocinas, com aumento de CCR3 (tipo 2) e CCR5 (tipo 1) e CCR4 (tipo 0) por neutrófilos no dia 7 pós vacinação com 17DD. [41]

FIGURA 6: A figura sintetiza as principais alterações imunológicas provocadas pelas vacinas antiamarílicas, plotadas em uma linha do tempo.



Fonte: FERREIRA et al 2017[1]

FIGURA 7: A figura sintetiza as principais alterações imunológicas provocadas pelas vacinas anti-amarelas.



Fonte: FERREIRA et al 2017[1]

1.8.3 Expressão gênica

A vacinação com a vacina 17D rapidamente induz uma modulação de genes que vai orquestrar a resposta imune inata e celular. O pico da expressão gênica ocorre em 7 dias pós-vacinação.[47]

Querec e colaboradores estudaram 15 indivíduos vacinados com 17D e encontraram 65 genes modulados pela vacina da febre amarela. Desses 65, 44 foram reconhecidos. Os principais genes envolvidos estão relacionados a produção de interferon e resposta antiviral do sistema imune inato como IRF7, STAT1 (fatores de transcrição que regulam interferons do tipo I), TLR7, RIG-I, MDA-5 (associados ao reconhecimento viral), assim como relacionados à ativação do complemento, ubiquinação ou ISGylation (modificação de proteínas por adição de produtos do gene estimulador de interferon).[43, 47]

Scherer e colaboradores analisaram a expressão gênica de células polimorfonucleares de 20 indivíduos vacinados com 17D-204 a fim de determinar uma assinatura gênica específica da vacina contra a febre amarela. Esse estudo identificou 615 genes que foram induzidos ou suprimidos no período de 4 a 7 dias pós-vacinação.[68] Esses genes referiam-se principalmente a processos biológicos imunes, como síntese de proteínas, apoptose, transdução de sinal e controles de transcrição. Os principais genes induzidos relacionavam-se ao interferon, como OAS1, OAS2, MX1, MX2, ISG15 E IFIT3 [68].

1.8.4 Imunidade em crianças

A vacina 17DD consta do calendário nacional de imunização brasileira desde 2005, devendo ser realizada aos 9 meses de idade em áreas endêmicas de febre amarela. [69]A soroconversão em crianças é habitualmente menor comparado à adultos.[34] Um estudo observacional da vacina 17DD mostrou taxas de soroconversão de 67% a 94% com diferenças em relação a faixa etária, sendo os menores valores em crianças de 9 -11 meses de idade.[70] Segundo Fernandes não há diferenças de imunogenicidade ou reatividade em relação às subcepas 17D-204 e 17DD. [34] Fatores que podem estar associados a menores taxas de soroconversão em crianças são: imaturidade do sistema imunológico, presença de anticorpos maternos e aplicação conjunta da vacina da febre amarela e tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola).[71]

Luiza-Silva e colaboradores estudaram 60 crianças saudáveis, de 9-43 meses de idade, submetidas a vacina 17DD. As análises de soro 30 dias após a vacinação mostraram aumento da síntese de IL-12 e TNF α , por neutrófilos e monócitos no grupo de crianças

sooroconvertidas. Além disso, houve um decréscimo da produção de IL-4, promovendo um ambiente pró-inflamatório. Por outro lado, o grupo que não soroconverteu apresentou padrões predominantemente regulatórios, com aumento de síntese de IL-5 e IL-10 por células TCD8⁺[72]. O grupo que não soroconverteu foi submetido à revacinação, e houve uma mudança no perfil de citocinas, com aumento de citocinas pró-inflamatórias.

O perfil de citocinas correlaciona-se com a resposta humoral. Altos níveis de anticorpos neutralizantes estão associados a um padrão pró-inflamatório (IL-12 produzida por neutrófilos e monócitos e IFN γ por neutrófilos), enquanto níveis medianos apresentam um padrão balanceado de citocinas inflamatórias e regulatórias. [72]

O pool de produção de citocinas deveu-se em grande parte a células da imunidade inata, representada por neutrófilos e monócitos. Essa foi a diferença entre o grupo que soroconverteu e aqueles que não soroconverteram, cuja síntese de citocinas por neutrófilos e monócitos esteve prejudicada. Curiosamente, na revacinação, onde houve 100% de soroconversão, ocorreu uma mudança nesse cenário, com síntese extra de citocinas por neutrófilos e monócitos.[72]

Campi-Azevedo e colaboradores compararam a imunogenicidade da vacina 17DD com a 17D-213/77 (derivada da cepa 17D-204) em 80 crianças. Ambas as cepas apresentaram um equilíbrio entre a produção de citocinas inflamatórias e regulatórias, sendo que na 17DD houve um predomínio de IL-12, enquanto na 17D-213/77 houve uma leve prevalência de produção de IL-10. [73] A resposta inflamatória da imunidade inata foi mais intensa no grupo vacinado com a 17DD com grande síntese de IL-12 e TNF α . Por sua vez, a vacina 17D-213/77 apresentou maior produção de IL-12 por células CD8. Não houve diferenças na produção de anticorpos neutralizantes entre os grupos. Entretanto, o subgrupo com maiores títulos de anticorpos neutralizantes da vacina 17DD possuía um perfil de citocinas pró-inflamatórias, no que diferia do grupo da vacina 17D-213/77, no qual predominava um perfil regulatório. Semelhante ao estudo conduzido por Luiza-Silva e colaboradores, os indivíduos que não soroconverteram apresentaram déficit de produção dessas citocinas pró-inflamatórias, o qual foi revertido na revacinação com 17DD.[73]

1.8.5 Imunidade em idosos

A imunosenescência é o envelhecimento do sistema imune, o que contribui para uma menor resposta a antígenos, vacinas e infecções em idosos. A imunidade adaptativa é a mais afetada, com encolhimento do repertório de células T e aumento de células de memória e efetoras tardias.[74] Outras alterações encontradas são redução de células B, aumento de

células NK e células dendríticas mielóides. [74] Essas alterações podem ser responsáveis por um maior risco de reações adversas em idosos, inclusive DVA-VFA cuja incidência é de 2,3-3,2:100000 naqueles maiores de 70 anos. [75]

Myaji e colaboradores (2013) realizaram um estudo observacional e prospectivo sobre os efeitos adversos relacionados à vacina antiamarílica 17DD em 828 idosos. Os resultados demonstraram a ocorrência de apenas efeitos adversos leves (mialgia, cefaléia, febre, dor no local da injeção) em cerca de 15% dos participantes. [76]

Esses resultados corroboram com os achados por Thomas e colaboradores que, por intermédio de uma revisão sistemática, avaliou estudos de registros de farmacovigilância e não encontrou grande número de eventos adversos graves em idosos. Nos casos relatados, em cerca de 50% dos idosos, outra vacina, além da antiamarílica, havia sido aplicada concomitantemente. [77]

Roukens e colaboradores realizaram um estudo prospectivo controlado para analisar a resposta humoral e a viremia após vacinação com 17D-204. Neste estudo compararam-se voluntários jovens (18-28 anos) com idosos viajantes (60-81 anos).[75] No 10º dia pós-vacinação, 77% dos jovens apresentavam anticorpos neutralizantes, contra apenas 50% dos idosos. Houve diferença significativa na média dos títulos dos anticorpos neutralizantes, com variação de 2,9 UI/mL no 14º dia, que se igualou no 28º dia. O grupo de idosos apresentou maiores taxas de viremia por períodos mais prolongados. [75]

1.8.6 Vacina antiamarílica em imunossuprimidos

As contraindicações à vacina são: alérgicos à proteína do ovo, gestantes, imunodeficientes devido a neoplasias, HIV/AIDS ou tratamento com imunossupressores. [6, 78] Em caso de gestantes que foram inadvertidamente vacinadas, sabe-se que o risco de infecção congênita é mínimo (2-3%). Entretanto a resposta imune da gestante é menor, devendo ser revacinada posteriormente. [7, 10, 78] Em relação aos portadores de HIV, recomenda-se a vacinação se a contagem de CD4 > 200 e houver risco de infecção, no caso de epidemias ou viagens para regiões endêmicas. [7, 78] Existem poucos estudos nesse grupo de pacientes, geralmente estudos retrospectivos ou relatos de casos, exatamente pela contraindicação de uso de vacinas de vírus vivo em imunossuprimidos. Há o risco teórico de desenvolvimento de reações adversas graves. Em relação aos pacientes reumáticos em uso de drogas imunossupressoras, os guidelines da sociedade brasileira de Reumatologia (SBR) e do EULAR (Joint European League Against Rheumatism) contraindicam o uso de vacinas de vírus vivos. [79-81]

Em relação à vacina de febre amarela, essa é uma questão particularmente preocupante no Brasil, por se tratar de área endêmica, com frequentes surtos da doença. Há a necessidade de se conhecer a imunogenicidade e reatogenicidade da vacina antiamarílica nestes pacientes. A seguir serão relatadas as evidências do uso da vacina antiamarílica neste grupo de indivíduos.

1.8.6.1 Vacinação em indivíduos HIV positivos

Veit e colegas estudaram 102 pacientes HIV positivos que foram vacinados com 17D-204. A vacina foi aplicada após o diagnóstico de HIV em pacientes que iriam viajar para países tropicais. Nenhum dos participantes apresentou efeito adverso grave, entretanto não havia histórico de medicações imunossupressoras e a média de contagem do CD4 era de 537 células/mm³[82]. Mensuraram-se os títulos de anticorpos neutralizantes pelo método do PRNT e estes foram comparados a um grupo controle saudável, HIV negativo. Observou-se que os grupos estudados apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes protetores, porém menores do que o grupo controle, com $p < 0,01$. Níveis altos de CD4 e baixos de carga viral correlacionaram-se com maiores títulos de anticorpos. [82]

Li Ho e colegas avaliaram a cobertura vacinal de adultos HIV positivos. Foram entrevistados 144 pacientes. Destes, apenas 7 haviam sido vacinados para febre amarela, sendo 2 com CD4 < 200 células/mm³. Neste estudo não foram dosados anticorpos neutralizantes, entretanto, não houve efeitos adversos decorrentes da vacinação. [83]

Tattevin e colegas, em um estudo retrospectivo, analisaram 12 indivíduos HIV positivos que se vacinaram com a vacina 17D-204 por motivos de viagem para regiões endêmicas. A média da contagem de CD4 era de 561 ± 363 células/mm³. Apenas um participante apresentou febre e faringite 5 dias pós-vacinação. Em todos houve formação de títulos de anticorpos protetores (média de 1/40). [84] Além disso, neste estudo, não houve variação na contagem de CD4 ou carga viral em comparação aos valores basais.[84]

Em outro estudo semelhante, 23 pacientes HIV positivos foram vacinados contra a febre amarela. [85] Não houve efeitos adversos graves e 93% dos participantes soroconverteram, contudo com retardo: de 5 pacientes cujo soro foi analisado 5 semanas após a vacinação, apenas 3 mostraram soroconversão. Com 1 ano, essa taxa subiu para 86%. [85] Esses dados sugerem uma resposta imune mais lenta à vacina nesse grupo de indivíduos. Em relação aos pacientes que já tinham registros de vacinação prévia contra a febre amarela, 7 de 9 indivíduos apresentavam anticorpos protetores. [85]

Corroborando os estudos anteriores, Pacanowski e colegas analisaram uma coorte de 364 indivíduos HIV positivos que foram submetidos à imunização com 17D-204.[86] Desses, 240 haviam se vacinado após o diagnóstico de HIV. Entre esse grupo, apenas 9 não alcançaram títulos protetores [teste de neutralização (NT) < 1/10]. Aqueles que apresentavam alta carga viral e menores valores de CD4 eram mais propensos à menor produção de anticorpos, com OR=0,83, p =0,001. Na análise multivariada, o único fator de risco identificável para a não soroconversão foi carga viral elevada. [86] Em relação ao subgrupo com CD4<200 células/mm³, que consistia de 14 participantes, todos apresentaram NT ≥ 1:10 após média de 4,6 anos pós-imunização. Não houve relatos de efeitos adversos graves. Os autores consideraram a vacina antiamarílica eficaz em indivíduos HIV positivos, com a imunogenicidade levemente prejudicada em comparação a indivíduos não infectados pelo HIV. O tempo de persistência de títulos protetores aparenta ser menor nesse grupo, sendo recomendado a dosagem dos mesmos em caso de risco de exposição ou intervalo menor de revacinação. [82, 85, 86]

Esses estudos levaram à recomendação de vacinar indivíduos HIV positivos que estejam expostos a áreas de risco e cujo CD4 seja superior a 200 células/mm³.

1.8.6.2 Vacinação em indivíduos transplantados

Há alguns poucos estudos que avaliaram a imunização em indivíduos transplantados. Azevedo e colegas relataram uma série de 19 casos de transplantes de órgãos sólidos, que estavam em uso de drogas imunossupressoras tais como: azatioprina, ciclosporina, deflazacort, micofenolato, prednisona, sirolimus e tacrolimus.[87] Não houve efeitos adversos. Neste estudo não foi feita dosagem de anticorpos.

Yax e colegas relataram um caso de um homem de 62 anos, diagnosticado com leucemia mielóide crônica que recebeu um transplante de medula óssea em 1997. Em 2005 recebeu a vacina antiamarílica 17D-204 antes de viajar para América do Sul. Na época não estava em uso de imunossupressores. Não houve efeitos adversos e a soroproteção foi confirmada pelo PRNT.[88]

Avelino-Silva e colegas relataram o caso de um paciente com leucemia mielóide aguda, que foi vacinado com 17DD 7 dias antes da quimioterapia. Seis meses após, recebeu um transplante alogênico de células tronco. A viremia durou cerca de 15 dias, monitorada pelo RT-PCR. [89, 90]. Não houve efeitos adversos e os títulos de anticorpos neutralizantes, dosados no d28 pós-vacina, foi de 3.103 mIU/ml. A fim de receber o transplante, fez uso de

ciclofosfamida, fludarabina, tiotepa, além de radioterapia. Cerca de 3 anos após o transplante, ainda apresentava altos títulos de anticorpos neutralizantes: 2.322 mIU/ml.[89]O artigo questiona a possibilidade de estimulação de células B residuais, entretanto não há como descartar contato com o vírus, haja vista que residia em área endêmica.

1.8.6.3 Vacinação em indivíduos com doenças reumáticas inflamatórias ou em uso de drogas imunossupressoras

Existem poucos estudos analisando a resposta à vacinação antiamarilica de pacientes com doenças reumáticas ou em uso de drogas imunossupressoras. Em sua grande maioria, são estudos observacionais, retrospectivos, devido ao impedimento ético de executar estudos randomizados controlados.

Mota e colegas analisaram 70 pacientes com diversas doenças reumáticas [AR, lúpus eritematoso sistêmico (LES), espondiloartrite (EA) e esclerose sistêmica (ES)].[91] Foi um estudo retrospectivo com o objetivo de verificar reações adversas após a vacinação inadvertida contra a febre amarela. Todos os participantes estavam em uso de imunossupressores. Apenas 22,8% dos pacientes relataram reações adversas leves como exantema, cefaleia, mialgia. Não houve efeitos adversos graves, hospitalização ou óbitos em decorrência da imunização. [91]

Oliveira et al analisaram, posteriormente, a presença de anticorpos neutralizantes em 31 pacientes com diagnósticos de doenças reumáticas, que haviam sido revacinados contra a febre amarela, de forma espontânea, ou seja, sem conhecimento do médico assistente. [92] Nesse período (2007-2008) houve um surto de febre amarela no Distrito Federal , o que levou a uma grande procura da vacina nos postos de saúde. Nesse estudo, foi realizado o PRNT, cujo valor protetor foi considerado ≥ 794 mIU/ml. Participaram do estudo 23 indivíduos com AR, 5 com LES, 2 com ES e 1 com espondilite anquilosante. Do total, 27 (87,1%) apresentaram títulos protetores de anticorpos neutralizantes, sendo o valor médio de 2.865,58 mIU/ml. As drogas imunossupressoras utilizadas para o tratamento da doença de base eram metotrexato (dose média de 13,28mg/semana), leflunomida (20mg/dia), infliximabe (3mg/kg a cada 8 semanas), hidroxiclороquina (400mg/dia) e havia 3 pacientes em uso de rituximabe (2 infusoes de 1g a cada 15dias). O menor valor de PRNT encontrado foi em um paciente que havia usado rituximabe cerca de 4 meses antes da revacinação. [92]

Scheinberg et al realizaram estudo com 17 pacientes com AR que foram revacinados para a febre amarela durante o tratamento com metotrexato e infliximabe. [93] Em 15 pacientes foi feita análise de sorologia por imunofluorescência pré e pós-vacinação. Os

resultados foram comparados com um grupo controle. A vacina antiamarílica foi aplicada 30 dias após a última infusão do antiTNF. Dos 17 pacientes, apenas 1 não soroconverteu. Houve uma tendência a menores títulos de anticorpos no grupo com AR.

Indo ao encontro desses resultados, há alguns relatos de casos na literatura, como a de uma senhora de 63 anos, com diagnóstico de doença de Crohn, que recebeu a vacina 17D-204 durante o uso de adalimumabe. [94] A vacina foi aplicada 4 dias antes da próxima dose, que é habitualmente realizada a cada 14 dias. Foram coletadas amostras sanguíneas nos dias 12, 18 e 26 pós-imunização para análise de RNA viral e anticorpos neutralizantes. Não houve efeitos adversos. Não se detectou viremia no dia 12 e a partir do dia 18, apresentou níveis protetores de anticorpos neutralizantes. Neste caso é importante salientar que era a primovacinação. [94]Stuhec relatou o caso de um homem de 27 anos, diagnosticado com artrite psoriática, tratado com metotrexato 20mg /semana.[95] Antes de receber a vacina antiamarílica, o metotrexato foi interrompido por 2 meses. Não houve efeitos adversos decorrentes da vacinação. Não foram realizados PRNT ou PCR.

A imunogenicidade a segurança da vacina 17D-204 foi avaliada em indivíduos em tratamento com corticosteroides. [96] Esse estudo observacional coletou dados de pacientes em uso de corticosteroides , que planejavam viajar para regiões endêmicas. O grupo controle consistiu de indivíduos saudáveis pareados em relação à idade e histórico de vacina contra a febre amarela. Foram arrolados 40 participantes no grupo de estudo e 77, no grupo controle. As principais doenças do grupo de estudo eram artrite reumatoide e doenças inflamatórias crônicas. A dose da prednisona ou equivalente variou de 5-20mg, sendo que 71% faziam uso por mais de 15 dias, com média de 10 meses de uso. Não houve eventos adversos graves, entretanto, o grupo em uso de corticoides apresentou maior frequência de reações leves, com risco relativo (RR)=8,0 e intervalo de confiança (IC) 95%: 1,4-45.9. Não houve diferença entre os grupos em relação a reações moderadas/ graves. Nesse estudo também foi realizada a dosagem de anticorpos neutralizantes pelo PRNT. Todos apresentaram títulos $\geq 1:10$. Não houve diferenças entre o grupo que previamente já havia recebido a vacina e os primovacinados.[96]Este trabalho é interessante por avaliar especificamente pacientes vacinados na vigência de corticoides, contudo a dosagem era baixa, não alcançando doses imunossupressoras. Além disso, como o estudo não foi cegado, pode ter ocorrido viés.

Recentemente, Wieten e colegas estudaram 15 pacientes imunocomprometidos que se vacinaram inadvertidamente ou após análise de risco-benefício realizada pelo médico assistente. [97] Foi realizada dosagem de anticorpos neutralizantes pelo PRNT, análise de PBMC e células T e análise do perfil de citocinas produzidas por linfócitos CD8 específicas

para o vírus da febre amarela. Os resultados foram comparados a um grupo controle composto de 41 indivíduos saudáveis, que foram pareados com relação à idade, sexo e tempo de vacinação. A dosagem de anticorpos neutralizantes foi semelhante entre os grupos, com 100% dos indivíduos imunocomprometidos com níveis protetores e 96,7% do grupo controle. As células CD8⁺ específicas, por sua vez, também foram comparáveis em relação à frequência com declínio gradual com o passar dos anos pós-vacinação. [97] Outros resultados encontrados foram que não houve diferenças significativas no perfil fenotípico e citotóxico das células T específicas, à exceção de uma baixa expressão de ki67 no grupo de pacientes, o que não foi visto no grupo controle. A produção de citocinas também foi equivalente entre os grupos. Este trabalho é importante por ser o primeiro que analisa o perfil de alterações imunológicas provocadas pela vacina antiamarílica em indivíduos imunocomprometidos, entretanto, a amostra é pequena e se torna ainda menor na análise de subgrupos que os autores realizaram.

Em outro estudo, Wieten et al analisaram amostras sanguíneas de 15 pacientes imunocomprometidos e 12 controles saudáveis, com o objetivo de comparar valores do PRNT e da sorologia por imunofluorescência.[98] Dos pacientes avaliados, 11 estavam em uso de metotrexato, 2 em uso de etanercepte, 1 em uso de prednisona e 1 em uso de leflunomida. A medicação foi interrompida cerca de 2 a 6 semanas em 3 pacientes. Pelo método do PRNT, 100% do grupo estudado apresentava níveis protetores de anticorpos neutralizantes contra 83,3% dos controles. Pela sorologia por imunofluorescência, apenas 47% do grupo estudado foram soropositivos e nenhuma amostra foi positiva no grupo controle. Não houve correlação entre o PRNT e a imunofluorescência.[98]

1.9 CÉLULAS DE MEMÓRIA

Os linfócitos T e B de memória são responsáveis pela rápida resposta à reinfecção e por definição, são células antígeno-específicas sobreviventes, que duram por longos períodos.[99] Entre suas características estão rápida produção de citocinas e alta capacidade de expansão sem a necessidade de ativação de receptores de coestimulação. [99]

1.9.1 Células T de memória

Células T naïve, após o encontro com o antígeno, são capazes de gerar múltiplos subtipos de células de memória, com diferentes propriedades fenotípicas e funcionais, além de perfis de expressão gênica diversos. [100]

O linfócito T naïve prolifera e diferencia-se em células T efetoras após o contato com o antígeno, que, por sua vez, migram para os tecidos periféricos e inflamados a fim de destruir alvos infectados. Grande parte das células efetoras morre, restando apenas uma pequena parte que se diferenciará em células de memória de longa duração. [100]

As células de memória usualmente expressam o marcador de superfície CD45RO, enquanto células naïve expressam CD45RA. CD27 (membro da superfamília de receptores de TNF) e CCR7 são usados em combinação com CD45RA para definir subtipos de linfócitos T de memória de acordo com suas propriedades efetoras. Linfócitos T CD8⁺ CD45RA⁻ que expressam CD27 produzem IL-2 e IFN γ , porém não possuem atividade citotóxica direta, denominadas de memória central, localizadas em órgãos linfoides secundários. Entretanto aqueles CD27⁻ produzem basicamente IFN γ e TNF, com alta capacidade citotóxica, são as células de memória efetora, localizadas em tecidos periféricos. Há outros subtipos de células de memória tais como: células de memória transicionais, efectoras terminais e residentes em tecidos. [100]

Além da atividade citotóxica, as células T CD8 de memória conferem proteção ao organismo ao orquestrar uma rápida e poderosa defesa recrutando e ativando múltiplas células efetoras do sistema imune inato.[101]

1.9.2 Células B de memória

As células B de memória são bastante abundantes no baço, onde compõem cerca de 45% das células B. Duram décadas no organismo e se mantêm sem a necessidade constante do estímulo antigênico.[102]

Apresentam como características a longa durabilidade, alta sensibilidade a pequenas quantidades de antígeno e eficiente proliferação e diferenciação na resposta secundária. Ao reencontrar o antígeno, diferenciam-se em células plasmáticas produtoras de anticorpos. CD27 é um marcador de células B de memória, que podem exibir IgM ou IgG, quando submetidas a troca de isotipo. [102]

Na sua origem, os linfócitos B primordiais ou naive são liberados da medula óssea para o sangue periférico. Estas células exibem os marcadores de superfície $CD19^+IgM^+$, não tiveram contato com antígeno e não sofreram, portanto mutação somática. [103]

Após o contato com o antígeno, ocorre uma migração para os órgãos linfoides secundários, onde podem localizar-se para o centro germinativo, sendo denominadas células B foliculares ou para a zona marginal, constituindo as células pré-ativadas. Os linfócitos dos centros germinativos expressam CD27 e a presença ou ausência de IgM ou IgD de superfície possibilita diferenciar as subpopulações de células de memória. [103]

As células de memória clássica sofrem hipermutação somática ($CD19^+CD27^+IgM^-IgD^-$) e tem a capacidade de fazer a troca de isotipo de cadeia pesada da IgM para as demais classes de imunoglobulinas, resultando na produção de IgG, IgA ou IgE. [103]

As células de memória não clássicas são aquelas localizadas na zona marginal que originam linfócitos $CD27^+IgM^+IgD^+$ que sofrem hipermutação somática limitada, com produção de IgM de alta afinidade e pequena quantidade de IgG.[103]

1.10 ARTRITE REUMATOIDE

A AR é uma doença autoimune crônica, que afeta principalmente as articulações periféricas promovendo sinovite. A persistência e atividade da doença levam a desgaste da cartilagem e erosões ósseas, com potencial perda de função articular. [104] A artrite reumatoide pode cursar com manifestações extra-articulares, como nódulos reumatoides, vasculite, acometimento pulmonar e comorbidades sistêmicas. [105] Acomete cerca de 1% da população mundial, sendo 2 a 4 vezes mais frequente em mulheres.[104]

1.10.1 Fisiopatologia da AR

A AR ocorre em indivíduos geneticamente predispostos e é desencadeada por fatores ambientais e epigenéticos ainda não totalmente elucidados.[104, 106] A susceptibilidade genética da AR reside principalmente em alelos HLA-DRB1 que contém o epítipo compartilhado, além de uma série de polimorfismos e outros loci genéticos. [106] O epítipo compartilhado, uma sequência de aminoácidos nas posições 70-74 da terceira região hipervariável da cadeia beta do gene DRB1[107], está associado à produção de anticorpos citrulinados na AR. [104] Em gêmeos univitelinos, há uma concordância de 15-30% no risco de desenvolver AR, sendo 4x maior do que em gêmeos dizigóticos. [108]

Os fatores ambientais implicados são tabagismo e doença periodontal causada por *Porphyromonas gingivalis*. [104] Sabe-se que esse último estimula a perda óssea ao ativar RANKL (ligante do receptor do ativador do fator nuclear $\kappa\beta$) por meio do TLR2. [106]

1.10.2 Imunopatogênese da AR

A AR causa infiltrados inflamatórios na sinóvia e no líquido sinovial, resultado de uma interação complexa entre a imunidade inata e adaptativa. [109] A hipótese mais aceita para o desenvolvimento da autoimunidade na AR é a perda de tolerância à citrulinização pós-translacional, o que leva à formação de anticorpos contra peptídeos citrulinados (ACPA). [108] A citrulinização é a substituição de arginina por citrulina, catalisadas pela enzima arginina deiminase. A presença de ACPA tem impacto na gravidade da AR, sendo usado no diagnóstico juntamente com o fator reumatoide (FR). O FR é um anticorpo contra a porção Fc de uma IgG e é produzido durante infecções. [108]

Os ACPA ativam macrófagos e osteoclastos por meio da formação de imunocomplexos, o que leva à perda óssea. Além disso, interagem com FR potencializando a resposta inflamatória. [105]

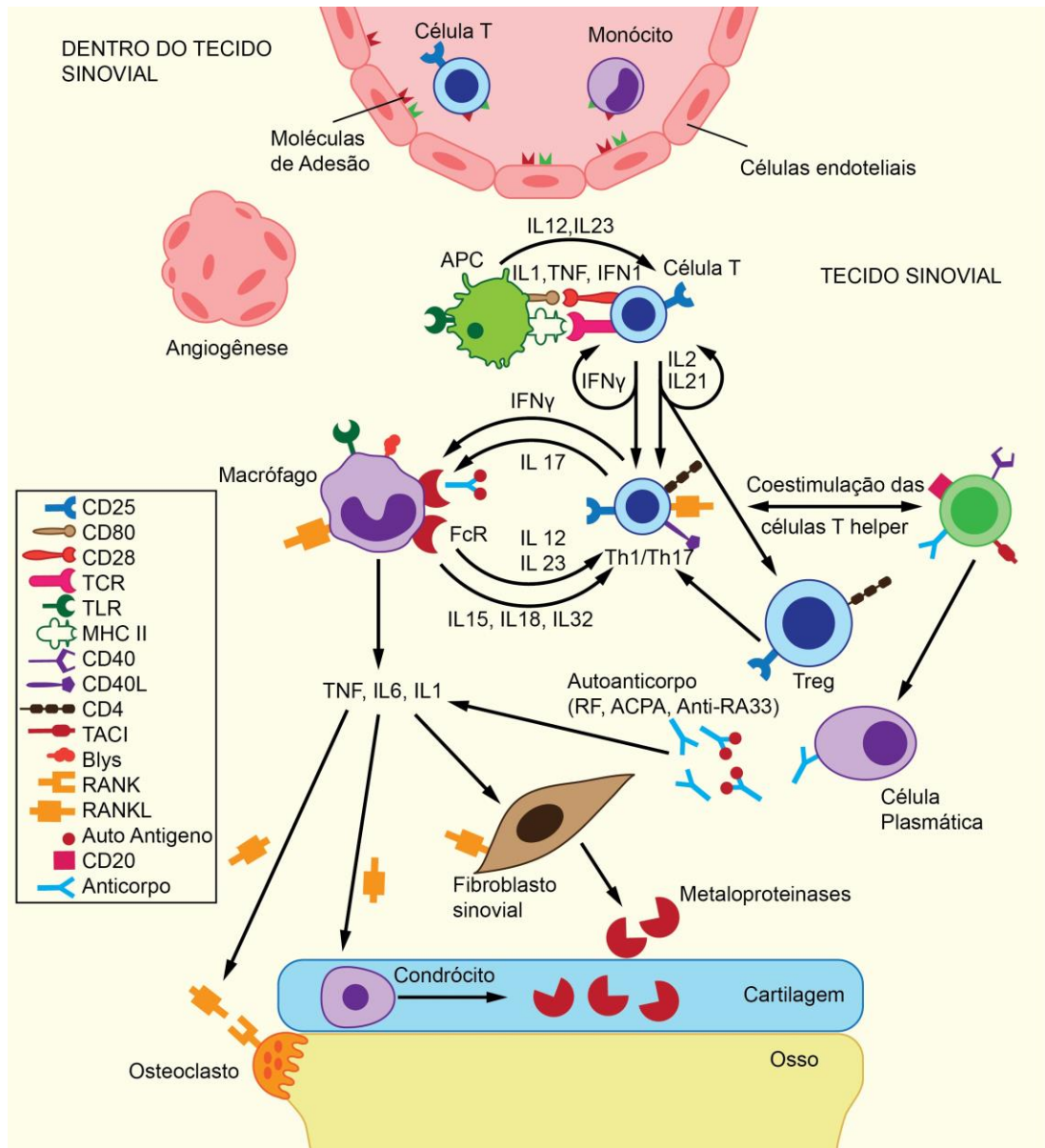
No tecido sinovial, a inflamação decorre da ativação do sistema imunitário inato, com afluxo de monócitos, células dendríticas, mastócitos; mas também do sistema imunitário adaptativo, com presença de células T helper-1 e T helper-17, células B e plasmócitos. [105] Linfócitos Th-1 produzem IFN γ , que possui conhecidos efeitos pró-inflamatórios. Linfócitos Th-17 produzem IL-17A, citocina associada a doença inflamatória crônica. A IL-17A induz à expressão de IL-1, IL-6, TNF α , metaloproteinases e quimiocinas por fibroblastos. A IL-23 favorece a expansão de células Th-17. [108] Ambas as linhagens Th1 e Th17 alteram a função do condrócito, prejudicando o reparo do colágeno. [108] Vide figura 8.

A membrana sinovial passa por modificações estruturais, com o desenvolvimento de angiogênese por estímulo de VEGF (fator estimulador de vasos). A ação do VEGF promove aumento da permeabilidade vascular e migração de células endoteliais. O tecido inflamatório sinovial, chamado pannus, produz vários outros fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que promovem alterações fenotípicas em fibroblastos e sinoviócitos. [108] O pannus assemelha-se a um tumor, pois possui capacidade de autoperpetuação e invasão de tecidos próximos. [108]

Os fibroblastos adquirem um perfil agressivo e inflamatório, com aumento do catabolismo de condrócitos e osteoclastogênese sinovial. A estimulação de osteoclastos é consequência da ligação do RANKL, presente nas células T e B e fibroblastos, ao RANK, presente em macrófagos, células dendríticas e pré-osteoclastos. A produção de metaloproteinases degrada a matriz cartilaginosa. Esse conjunto orquestrado promove a destruição articular. [105]

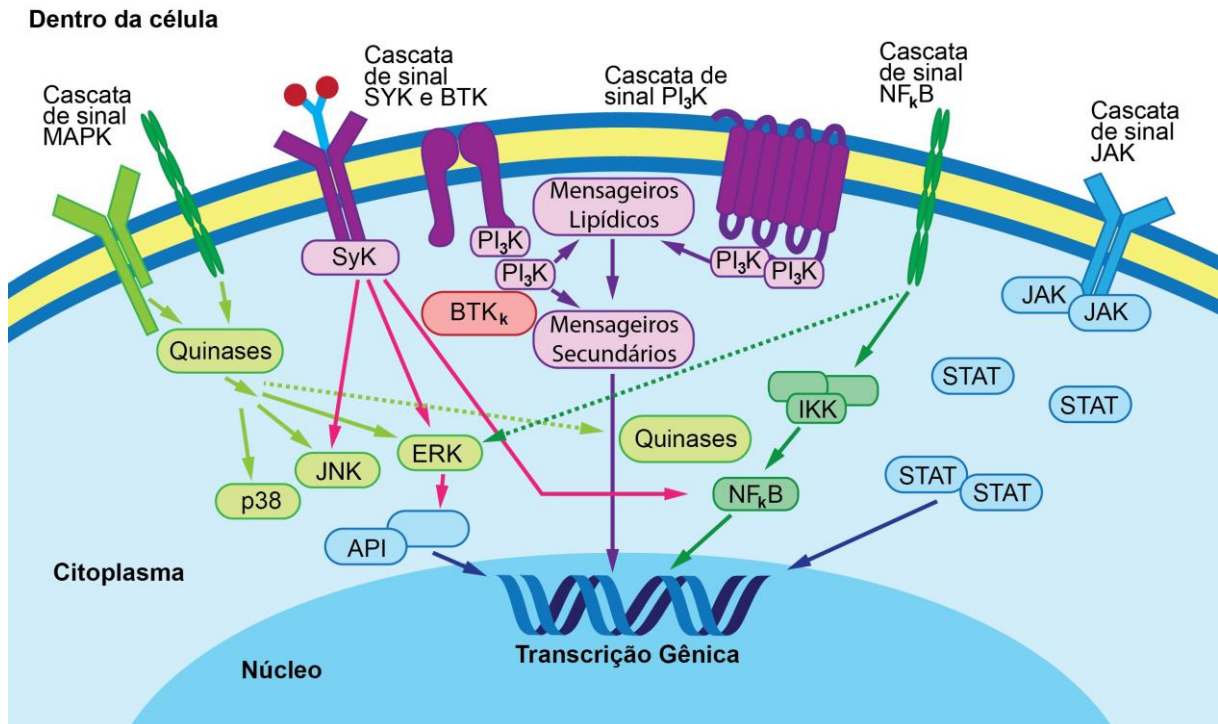
As citocinas, por sua vez, participam da resposta inflamatória ao ativar células endoteliais e atrair linfócitos B e T para a sinóvia. Disparam eventos de transdução de sinais intracelulares responsáveis por ativar genes que fortalecem a resposta inflamatória. As principais citocinas implicadas são TNF, IL-6, fator estimulador da colônia de monócitos/granulócitos (GM-CSF). [105] Vide figura 9.

Figura 8. Eventos imunológicos que ocorrem no tecido sinovial em pacientes com AR.



Fonte: Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. Lancet 2016; 388:2023-38. Adaptado por Luís Henrique Oliveira.

Figura 9. Cascata de transdução de sinais que ocorrem no interior da célula em pacientes com AR.



Fonte: Coates LC, Fitzgerald O, Helliwell PS, Paul C. Psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis: Is all inflammation the same? *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2016;46:291-304. Adaptado por Luís Henrique Oliveira.

1.10.3 Diagnóstico e manejo da AR

O diagnóstico da AR baseia-se em critérios clínicos e laboratoriais, que auxiliam o diagnóstico, entretanto são considerados critérios classificatórios e não diagnósticos. Em 2010 os novos critérios foram formulados a fim de aumentar a sensibilidade e o poder de detecção da AR precocemente, a fim de evitar a incapacidade e a deformidade articular. [110] Para classificar um indivíduo com AR é preciso ao menos uma articulação edemaciada e 6 de 10 pontos, que incluem a titulação de fator reumatoide e/ou ACPAs, elevação de reagentes de fase aguda e envolvimento articular. A duração dos sintomas também é importante, sendo que ≥ 6 semanas fortalece o diagnóstico de AR.[110]

No manejo da AR, objetiva-se a remissão clínica sustentada, ou quando isso não for possível, baixa atividade de doença. A longo prazo, um tratamento guiado por objetivos claros e precisos conduz a um desfecho favorável, com menores índices de dano estrutural e funcional.[111]

Para avaliar atividade de doença são utilizados índices compostos de atividade de doença, tais como: DAS28 (Disease Activity Score), SDAI (Simplified Disease Activity Index) e CDAI (Clinical Disease Activity).

O DAS ou DAS28 é um índice que calcula atividade de doença com base na contagem de articulações edemaciadas, articulações dolorosas, na avaliação global do próprio indivíduo e do médico assistente (escala visual analógica), além de contabilizar o valor do VHS (velocidade de hemossedimentação) ou PCR (proteína C reativa).[112]

O SDAI é a somatória do número de articulações edemaciadas, número de articulações dolorosas, avaliação global pelo médico e pelo paciente e valor do PCR em mg/dl.

O CDAI é um cálculo simplificado do número de articulações edemaciadas, número de articulações dolorosas, avaliação global pelo médico e pelo paciente.[112]

Os valores de cada índice para categorização do grau de atividade de doença seguem abaixo:

- DAS28
 - Alta - $>5,5$
 - Moderada $\leq 5,5$
 - Baixa $\leq 3,6$
 - Remissão $\leq 2,4$

- SDAI
 - Alta >26
 - Moderada ≤ 26
 - Baixa ≤ 11
 - Remissão <3

- CDAI
 - Alta > 22
 - Moderada ≤ 22
 - Baixa ≤ 10
 - Remissão $<2,6$

1.10.4. Imunomoduladores e mecanismo de ação

O tratamento da AR é realizado com drogas imunomoduladoras ou imunossupressoras com o objetivo de controlar a atividade da doença e evitar as deformidades. Atualmente, preconiza-se o tratamento precoce, da artrite de início recente, com 6 semanas de evolução, com o intuito de aproveitar a janela de oportunidade e evitar erosões. [113] As medicações

modificadoras do curso da doença (MMCD) sintéticas e biológicas são o arsenal terapêutico empregado na AR. As MMCD sintéticas mais utilizadas são o metotrexato, leflunomida, sulfassalazina e hidroxicloroquina. Dentre as MMCD biológicas, temos os antiTNF como adalimumabe, etanercepte, infliximabe, golimumabe e certolizumabe pegol. Além dessas, outras medicações biológicas com eficácia terapêutica na AR são tocilizumabe, rituximabe, abatacepte. Recentemente, os inibidores de JAK como baricitinibe e tofacitinibe foram acrescentados ao rol de medicações com potencial impacto de modificar o rumo da AR.

O metotrexato é droga âncora no tratamento da AR, apresentando excelente custo-benefício. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido. [114] É uma droga antifolato, que age inibindo a enzima dihidrofolato redutase. [115] Estudos mostram redução nos níveis séricos de IL-1B, IL-6 e IL-8[114], provavelmente por meio da supressão da ativação da via de transdução de sinal JAK/STAT.[116] Além disso, aumenta as concentrações de adenosina, o que favorece o aumento na população de Tregs, com consequente aumento da expressão de FoxP3 e CTLA-4 [117], contribuindo para seus efeitos antiinflamatórios.[115, 118]

A leflunomida, por sua vez, age modulando o sistema imunitário por meio da inibição da enzima dihidroorotato desidrogenase, que coordena a síntese de pirimidinas, culminando na inibição da proliferação de linfócitos B e T. [119] Estudos em animais mostraram que o tratamento com leflunomida leva à diminuição no número de células Th-17 ao promover downregulation do fator de transcrição ROR- γ t e IL-21.[120]

A hidroxicloroquina é uma droga antimalárica que, in vitro, é capaz de inibir a produção de IL-6, IL-17 e IL-22.[121] Outros mecanismos de ação estabelecidos são antagonismo dos receptores Toll-like e inibição da produção de citocinas inflamatórias e apresentação de antígenos por macrófagos. [122] Além disso, a hidroxicloroquina pode induzir a apoptose de células efectoras e de memória CD45RO⁺ ao inibir o mecanismo de autofagia. [122]

Os inibidores de TNF são 5 aprovados para o tratamento da AR: adalimumabe, etanercepte, infliximabe, golimumabe e certolizumabe pegol. O TNF é uma molécula chave na regulação de processos inflamatórios e sua neutralização leva à redução de IL-1, IL-6 e moléculas de adesão, com prejuízo para ativação e migração de leucócitos. [123] Tanto o adalimumabe quanto o golimumabe são anticorpos monoclonais totalmente humanizados que se ligam ao TNF solúvel e ligado à membrana. O infliximabe é um anticorpo monoclonal quimérico com componentes humano e murino. O certolizumabe pegol é um fragmento humanizado peguilado Fab que reconhece o TNF solúvel e ligado à membrana. O etanercepte,

por sua vez, é uma proteína recombinante de fusão formada por 2 receptores solúveis de TNF ligados à porção Fc de uma IgG1 humana.[123]

O abatacepte é uma molécula quimérica CTLA4-IgG que modula a ativação de linfócitos T ao bloquear a coestimulação via CD28. [124] Há decréscimo dos subtipos de células T helper Th-1, Th-2 e Th-17. As células Treg também sofrem redução. Esses efeitos são vistos principalmente em pacientes ACPA positivos. [124] Abatacepte também possui ação em linfócitos B, com diminuição da troca de isotipos de cadeia pesada, menor formação de linfócitos B de memória e consequente redução dos níveis de anticorpos e imunoglobulinas. [125]

Tocilizumabe é um anticorpo monoclonal que bloqueia o receptor da IL-6. Foi observado, em pacientes com arterite de células gigantes tratados com tocilizumabe, que esta aumentou a frequência de linfócitos Treg ativados e recuperou sua capacidade proliferativa. [126]

Rituximabe é um anticorpo monoclonal contra a molécula CD20 presente em linfócitos B maduros e células pré-B. Possui eficácia comprovada na AR promovendo a depleção de linfócitos B periféricos e também aqueles localizados na sinóvia, no tecido linfoide e medula óssea. [127] Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado.

Tofacitinibe e baricitinibe são drogas orais não biológicas, que atuam como inibidores da JAK. São pequenas moléculas que atravessam a membrana plasmática por difusão celular e impedem a ativação e fosforilação das STAT, levando à menor produção de citocinas. [128] Preferencialmente, o tofacitinibe compete com JAK1 e JAK3 e, em menor nível, com JAK2.[128]

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, o Brasil tem vivenciado frequentes surtos de febre amarela, com aumento progressivo do número de casos. Houve, também, uma expansão considerável da área de risco de infecção pelo vírus da febre amarela, com conseqüente ampliação mandatória da área territorial de cobertura vacinal antiamarílica.

A eficácia vacinal deve-se ao estabelecimento de uma resposta imune complexa, envolvendo elementos da imunidade inata e adaptativa humoral e celular. Nesse contexto, a integridade do sistema imune dos indivíduos vacinados tem sido considerada como peça fundamental na manutenção do estado de imunidade protetora antiamarílica. Diversos estudos têm demonstrado que distúrbios nos eixos da imunidade inata e adaptativa são responsáveis pela ocorrência de eventos adversos associados com a perda de imunidade.

Tal resposta imune deficiente em pacientes usuários de imunomoduladores pode comprometer a duração da memória vacinal protetora. O estudo da resposta imune protetora a médio e longo prazo em indivíduos imunossuprimidos pode fornecer dados inéditos e ampliar o conhecimento acerca da imunidade vacinal antiamarílica, contemplando aspectos relevantes da análise fenotípica de células T e B de memória bem como o estudo de assinatura de citocinas associados aos estudos clássicos de soroneutralização *in vitro* – PRNT.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

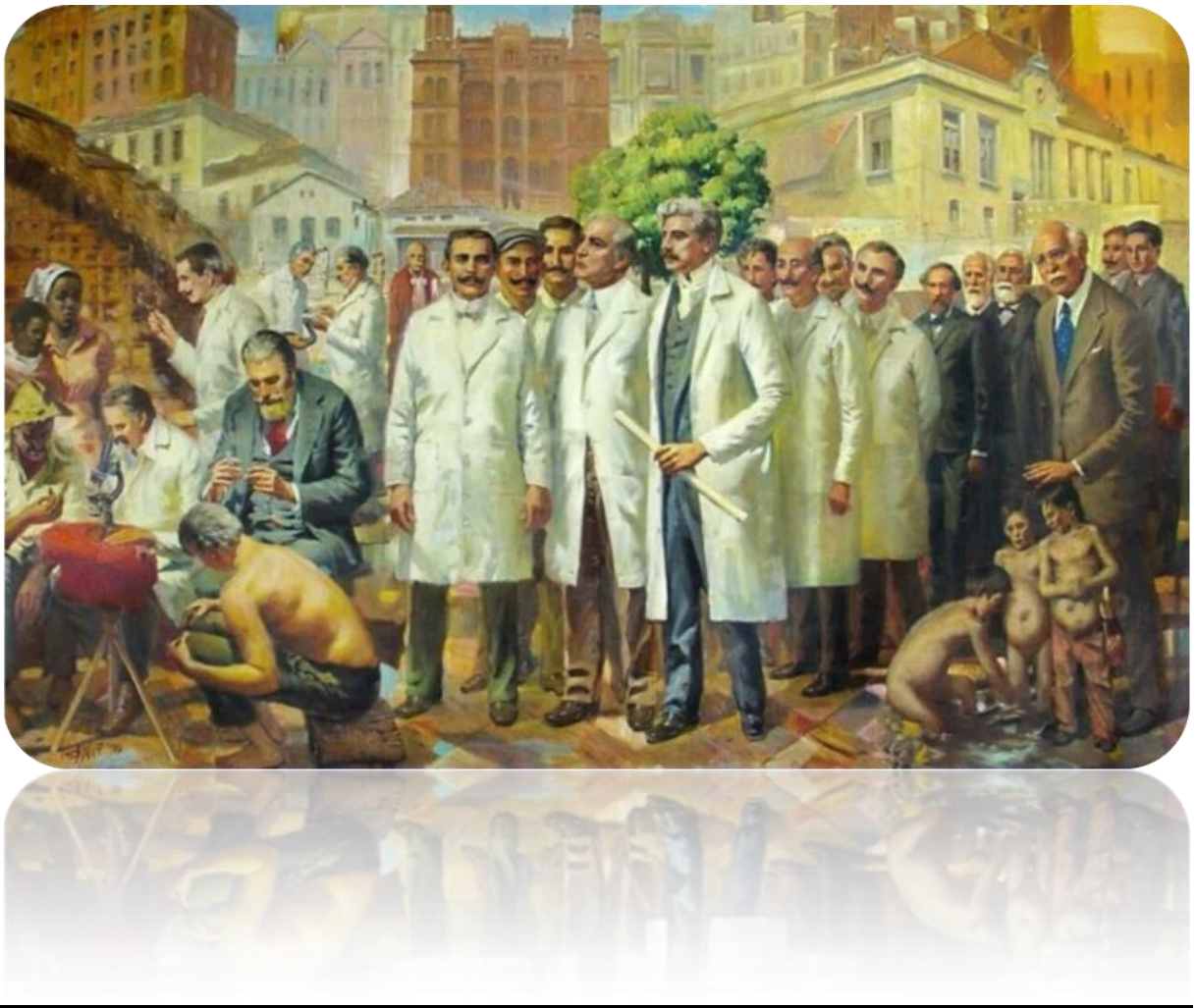
Verificar se grupos específicos de imunomoduladores (biológicos, sintéticos ou uma combinação destes) utilizados no tratamento clínico de indivíduos com artrite reumatoide exercem impactos diferenciados na duração da memória vacinal desses indivíduos, quando previamente imunizados com a vacina antiamarílica 17DD.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar e comparar a proporção de soropositividade e a média de reatividade dos títulos séricos de anticorpos neutralizantes contra a febre amarela em indivíduos com AR, em uso de terapias imunomoduladoras, previamente imunizados com 17DD.

2. Avaliar o perfil fenotípico /funcional de células T, antígeno-específicas para o VFA, de indivíduos com diagnóstico de artrite reumatoide, previamente imunizados com a vacina antiamarílica 17DD, estratificados conforme o grupo de imunomoduladores em uso (biológicos, sintéticos ou uma combinação destes) e segregados de acordo com o tempo pós-vacinação.

3. Avaliar o perfil fenotípico /funcional de células B, antígeno-específicas para o VFA de indivíduos com diagnóstico de artrite reumatoide, previamente imunizados com a vacina antiamarílica 17DD, estratificados conforme o grupo de imunomoduladores em uso (biológicos, sintéticos ou uma combinação destes) e segregados de acordo com o tempo pós-vacinação.



Pintura alegórica que retrata as campanhas de erradicação da febre amarela e da varíola lideradas por Oswaldo Cruz. Academia Nacional de Medicina, RJ.

PACIENTES E MÉTODOS

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1 PARTICIPANTES

Entre 17 de setembro de 2014 e 6 de dezembro de 2016, 136 pacientes adultos (≥ 18 anos), que preencheram critérios do American College of Rheumatology (ACR) para AR foram selecionados para participar neste estudo. Eram pacientes acompanhados regularmente no ambulatório de AR do Hospital Universitário de Brasília, filiado à Universidade de Brasília, em Brasília, DF. Haviam recebido a vacina antiamarílica 17DD, de forma inadvertida. A confirmação da vacinação se deu pela checagem dos cartões de vacina. Quinze pacientes foram excluídos do estudo, sendo 12 por apresentarem tempo de vacinação < 1 ano, ou > 30 anos e três por apresentarem dados incompletos.

Os participantes foram subdivididos em 2 grupos em relação ao uso de MMCD sintéticos ou biológicos. O primeiro grupo, a quem chamaremos de **MMCDsc**, era composto por indivíduos em uso de MMCD sintéticos. O segundo grupo, **MMCDsc+b**, era composto por indivíduos que estavam em tratamento com MMCD sintéticos associados a biológicos. Posteriormente, em cada grupo, os participantes foram segregados por tempo decorrido da vacinação com 17DD em:

- [1-5) anos - 1 ano incluso e 5 anos completos excluído
- [5-10) anos 5 anos incluso e 10 anos completos excluído
- ≥ 10 anos

O grupo controle foi subdividido em 5 subgrupos com 2 grupos pareados:

- indivíduos não vacinados - NV (dia0); n=46. A coleta de sangue foi realizada antes da aplicação da vacina.
- indivíduos primovacinados – PV (dias 30-45); n=46. A coleta de sangue foi realizada após 30-45 dias da aplicação da vacina.

Os grupos NV (dia 0) e PV (dias 30-45) foram pareados. A faixa etária foi de 18-19 anos.

O grupo controle também foi composto de 3 grupos de voluntários hígidos que foram segregados de acordo com o tempo pós-vacinação:

- CONT [1-5) anos;

- CONT (5-10] anos;
- CONT \geq 10 anos.

O grupo de voluntários foi composto por acompanhantes de pacientes e funcionários do Hospital Universitário de Brasília.

4.1.1 Critérios de inclusão

- Idade maior do que 18 anos;
- Capacidade de compreensão e preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Diagnóstico de artrite reumatoide feito por reumatologista;
- Uso de imunossupressores (corticoesteróides, metotrexato, leflunomida, ciclosporina, ciclofosfamida, azatioprina, infliximabe, etanercepte, adalimumabe, rituximabe, abatacepte, tocilizumabe e tofacitinibe) para controle da doença reumática de base;
- Apresentação do cartão de vacinação contendo os dados sobre a vacina antiamarílica (confirmação da vacinação e data).

4.1.2 Critérios de exclusão

- Gestantes
- Doença mental orgânica, funcional ou oligofrenia, que comprometam a qualidade da informação fornecida pelo paciente;
- Doença infecciosa ou neoplásica atual.

É importante salientar que os indivíduos do grupo de AR e do grupo CONT já haviam sido vacinados previamente, apenas foi feita conferência da data no cartão de vacina. Portanto, por serem residentes em área endêmica, é bem possível tratar-se de revacinação. No caso do grupo AR, a revacinação foi inadvertida, já que a vacina da febre amarela é contraindicada em pacientes imunossuprimidos. Os grupos pareados NV (dia0) e PV (dias 30-45), por sua vez, eram indivíduos hígidos não vacinados em que a vacina foi aplicada pelos pesquisadores, tratando-se, portanto, de uma primovacinação.

4.2 MÉTODOS

As amostras biológicas dos grupos de AR (MMCDsc e MMCDsc+b) e dos grupos controle CONT foram coletadas em Brasília, DF, no Hospital Universitário de Brasília e encaminhadas no mesmo dia para FIOCRUZ – Instituto René Rachou, em Belo Horizonte, MG, por via aérea, onde foram analisadas. As amostras eram devidamente identificadas e embaladas em uma caixa de transporte própria para material biológico.

No dia da coleta, o cartão de vacina era checado e era realizado uma entrevista com o paciente e feita revisão de prontuário. Nesta ocasião, inicialmente, explicava-se todo o procedimento da pesquisa para o indivíduo, e este, espontaneamente, se assim fosse de sua vontade, preenchia o termo de consentimento livre e esclarecido.

As amostras biológicas dos grupos NV (dia0) e PV (dias 30-45) foram coletadas no Rio de Janeiro, no período de 2010-2011.

A figura 10 ilustra a população de estudo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisas em humanos do Instituto de Pesquisas René Rachou FIOCRUZ (CPqRR#180911). Todos os participantes forneceram consentimento por escrito, em acordo com a Declaração de Helsinki.

Figura 10. População de estudo

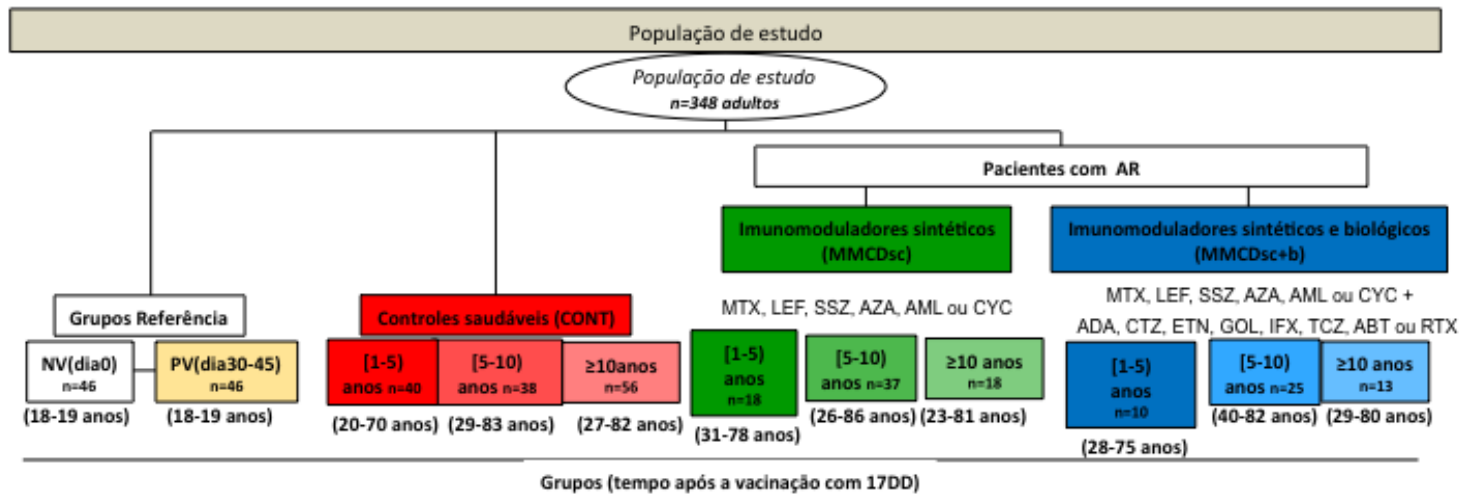


Figura 10. População de estudo. Um total de 348 adultos foram selecionados para o estudo. Os indivíduos com AR (n=121), previamente vacinados contra FA, foram categorizados em 2 grupos: **MMCSsc**, aqueles em uso de MMCD sintéticos e **MMCDsc+b**, aqueles em uso de MMCD sintéticas e biológicas. Os participantes do estudo foram subdivididos em relação ao tempo decorrido de vacinação, conforme cartão de vacina: **MMCSsc** [1-5] anos, **MMCSsc** [5-10] anos, **MMCSsc** ≥10 anos e **MMCDsc+b** [1-5] anos, **MMCDsc+b** [5-10] anos, **MMCDsc+b** ≥10 anos. O grupo controle compo-se de 226 participantes divididos em 5 subgrupos: indivíduos não vacinados [NV(dia0)]; primovacinados [PV(dias 30-45)] e 3 grupos de voluntarios que , por sua vez, também foram subdivididos de acordo com o tempo pós-vacinação: CONT[1-5] anos, CONT[5-10] anos, CONT≥10 anos. Feitas análises de biomarcadores imunológicos e dosagens de PRNT para cada indivíduo.

4.2.1 Amostras biológicas

Foram coletados 20 mL de amostras de sangue periférico, 6 mL colhidos na ausência de anticoagulante e 14 mL colhidos em heparina. As amostras de sangue, colhidos na ausência de anticoagulante, foram submetidas a processamento preliminar para a titulação de anticorpos neutralizantes (PRNT), as quais foram comparadas aos indivíduos do grupo controle, pareados por período de vacinação. As amostras de sangue colhidas em heparina, foram empregadas para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico-PBMC, que foram avaliadas quanto à expressão de biomarcadores fenotípicos de memória e produção de citocinas intracitoplasmáticas na presença e ausência do antígeno vacinal de febre amarela.

4.2.2 Titulação de anticorpos neutralizantes-PRNT

O PRNT é considerado o teste mais sensível e mais específico para febre amarela [35] produzindo resultados quantitativos (em Unidades Internacionais) que se correlacionam com proteção. Baseia-se no princípio de que os anticorpos específicos possam conter a multiplicação viral. Possui acurácia superior ao ELISA ou teste de inibição da hemaglutinação. [129] O PRNT mensura o nível de anticorpos neutralizantes em uma amostra de soro. Determina-se a capacidade de bloquear a formação de plaques virais em células Vero a partir de uma quantidade conhecida de vírus. [130] O título de anticorpos neutralizantes dos voluntários foi determinado pelo teste de neutralização por redução de 50% das placas de lise (PRNT50) em monocamadas de células Vero. O teste foi realizado no Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos, FIOCRUZ (LATEV, FIOCRUZ- RJ). Após a coleta sanguínea, o soro é obtido via centrifugação (400xg, 10 minutos, 18°C). As amostras são submetidas a diluições seriadas, iniciando com 1:5 em placas de cultura celular de 96 poços.

Para dar início aos procedimentos, distribuir 50µL de meio em toda a placa, exceto nos orifícios H1 a H12. Colocar 80µL de meio nos orifícios H1 a H10 e 90µL de meio no orifício H11. Adicionar 20µL das amostras de soro a serem testadas aos orifícios H1 a H10, assegurando-se de que não haverá mistura das amostras (uma amostra em cada orifício). Colocar 10µL do soro padrão no orifício H11. O soro padrão provém de macaco Rhesus, vacinado contra febre amarela, apresentando alto título de anticorpos contra febre amarela, e padronizado frente a um soro de referência internacional da OMS (NIBSC código: YF). O soro padrão é repetido a cada dez amostras testadas. Diluir com pipeta multicanal de 12 no sentido de H para A da microplaca, (exceto na coluna 12), passando 50µL para o orifício seguinte e desprezando 50µL da última diluição. Posteriormente, adicionar 50µL de vírus

referência (cepa 17D 213/77, lote x,) previamente diluído em todos os orifícios da placa, na concentração de 30 unidades formadoras de placas. Cobrir e deixar por 1h à temperatura ambiente e preparar uma suspensão de células Vero. Colocar 50 μ L da suspensão de células em todos os orifícios da placa e incubar por 3 h a 37°C em incubadora BOD. Descartar o meio batendo a placa sobre uma toalha estéril e colocar 100 μ L de meio com CMC 2,7%. Incubar por 7 dias a 37°C em incubadora com 5% de CO₂ a fim de ocorrer a adsorção do vírus não neutralizado e a formação das monocamadas celulares.

Após 7 dias de incubação, observar ao microscópio para certificar-se de que houve formação de plaques. Adicionar 100 μ L de formol 10% em todos os orifícios da placa, assegurando-se que o formol tenha atingido o tapete celular. Deixar por 1h a temperatura ambiente. Após 1h retirar o formol por inversão vigorosa das placas. Lavar cada placa, mergulhando-a numa cuba com água corrente com cuidado para que o jato de água não bata diretamente na placa e invertendo-a vigorosamente. Repetir este procedimento até a completa remoção do CMC. Colocar 100 μ L de cristal violeta 1% em todos os orifícios da placa. Deixar por 15 minutos a temperatura ambiente e retirar através de lavagem em água corrente, repetindo o procedimento para remoção do CMC. Em seguida, secar as placas a 37°C. Contar os plaques de todos os orifícios da placa, começando pelos orifícios do vírus referência H12 até A12 e continuar sucessivamente até o final da placa. Colocar os resultados das leituras numa tabela.

O título do PRNT é definido como o valor da última diluição em que há redução de 50% das placas formadoras em relação ao teste padrão. Para obter o cálculo do título: 1) Fazer a média aritmética do número de plaques referente ao vírus. 2) Calcular o “endpoint” do vírus ou 50% do número de plaques do vírus. 3) Montar uma tabela com o log das diluições do soro padrão, anotando as leituras dos plaques de cada placa referentes a cada diluição. Fazer a média do número de plaques de cada diluição. 4) Transportar o valor referente a 50% do número de plaques do vírus (item 2) para a tabela do item 3 e calcular a diluição correspondente através de regressão linear com interpolação das diluições imediatamente acima e abaixo do valor que corresponde a 50%. 5) Para calcular o fator de correção do título de proteção, acha-se o antilog da diluição correspondente a 50% do número de plaques do vírus encontrado no item 4. Divide-se 29200mUI/mL referente ao soro padrão nacional pelo antilog achado e transforma-se o resultado em log. 6) O mesmo valor referente a 50% do número de plaques do vírus é aplicado na tabela de soros testes e por regressão linear acha-se a diluição correspondente. A este valor soma-se o fator de correção do item 5. Este será o

título final do soro teste em log mIU/mL e o seu antilog em mIU/mL. 7) O “baseline” será o valor achado no item 5 em antilog, multiplicado por 2 em mIU/mL.

Dessa forma, é possível transformar os resultados em logaritmos (log₁₀) na unidade de mili-Unidades Internacionais por mililitro(mUI/ml). O ponto de corte aplicado foi de 2,9 log₁₀ mIU/ml para separar amostras soropositivas de soronegativas. [129, 131]

4.2.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Quatorze mililitros de sangue total foram coletados em tubos contendo o anticoagulante heparina sódica. O sangue total heparinizado foi lentamente adicionado a uma solução de histopaque 1077[(Sigma Aldrich, #H8889) solução de polissacarídeo e meio de contraste radiopaco, que é usado para isolamento de linfócitos] [49], na proporção de 2:1, em tubos de poliestireno com capacidade para 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 400 x g durante 40 minutos a 20°C em centrífuga refrigerada. Ao final da centrifugação, um anel de células mononucleares (PBMC) foi obtido entre a interface do histopaque e do plasma.

O plasma foi retirado cuidadosamente e as PBMC foram coletadas e transferidas para tubos cônicos, de polipropileno, de 50 mL onde foram lavadas 3 vezes por centrifugação a 400 x g por 10 minutos a 4°C em meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium). Finalmente, as células foram ressuspensas em RPMI 1640 (solução de suporte para crescimento de cultura de células), contadas em câmara de Neubauer, e ajustadas para a concentração desejada de acordo com o ensaio a ser realizado. Toda a manipulação, exceto a contagem de células, foi realizada em condições estéreis em capela de fluxo laminar.

4.2.4. Cultura de PBMC

Amostras de PBMC mantidas em cultura na ausência (Cultura Controle) e presença do antígeno vacinal 17DD (Cultura Estimulada) foram empregadas para a análise das frequências de linfócitos T de memória por citometria de fluxo. A cultura de células foi realizada segundo procedimento descrito por Gazzinelli et al, com algumas modificações descritas em seguida. As células foram ressuspensas em meio de cultura de células estéril (CMBlast) contendo 5% de soro humano normal AB Rh+ (SHuN), inativado a 56°C durante 30 minutos, 1,6% de L-glutamina (Winlab, #G-6392) e 0,03% de um coquetel de antibiótico e antimicótico (100U/mL de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 0,25 mg/ml de anfotericina B; Sigma, #P3539) diluídos em RPMI 1640 (Gibco, # 23400-021).

Para estimulação pelo antígeno vacinal 17DD (lote#103VFC015Z- Bio-Manguinhos-FIOCRUZ), 1.0 x 10⁶ PBMC foi adicionado em cada poço, com volume final de 800µl. O

cultivo celular foi realizado em placas de poliestireno, de fundo chato, de 48 poços por 6 dias. As culturas foram mantidas em incubadora contendo 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37°C, durante 6 dias. As concentrações de cultura estabelecidas como ótimas foi de 250 LD50 por poço[57, 132].

4.2.5. Imunofenotipagem de células T e B de memória

Após 6 dias de cultura, as placas de 48 poços foram centrifugadas à 1500 x rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foram coletados 600 µl do sobrenadante/poço e transferidos para microtubos de 1.5 mL, que foram armazenados a -70°C. Foram adicionados 500 µl de tampão fosfato-salino (PBS) 1X estéril em cada poço, as células foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril e transferidas para microtubos de 1,5 mL. Este material foi centrifugado à 14.500 rpm, por 90 segundos, à temperatura ambiente.

A placa foi lavada mais uma vez com 500µl de PBS 1X estéril por poço e o material foi centrifugado como descrito anteriormente. Após a última centrifugação, todo o sobrenadante foi armazenado a -70°C. Coletadas as células dos poços e transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL, utilizando pipeta Pasteur de plástico, homogeneizar com 500µL de PBS 1X gelado. Esse procedimento foi repetido três vezes. Adicionado 1mL de PBS-W 0,015 M, pH 7,2 [tampão de lavagem contendo 0,5% de albumina bovina (BSA) e 0,1% Azida sódica, todos da Sigma Chemical Company] a cada tubo e homogeneizado em vórtex, as amostras foram centrifugadas a 1300 rpm, 4°C por 7 minutos, vertido o sobrenadante, secado delicadamente e homogeneizado em vórtex. Acrescentado 1,0mL de PBS 1X gelado e 1,0mL de Violet Fluor Reagent Dye [(LIVE/DEAD), Life Technologies, #L34955], homogeneizado em vórtex e incubado por 15 minutos a 4°C, no escuro. Adicionado 1,0 mL de PBS-W gelado, centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos a 4°C, vertido o sobrenadante, secado delicadamente, homogeneizado em vórtex. Adicionado 50µL do coquetel de anticorpos anti-superfície: anti-CD4/(RPA-T4)/FITC, anti-CD8/(SK1)/PerCP-Cy5.5, anti-CD27/(M-T271)/PE, anti-CD45RO/(UCHL1)/PE-Cy, anti-CD3/(SK7)/APC-Cy7, anti-IgD/(IA6-2)/FITC, anti-CD27/(M-T271)/PE e anti-CD19/(HIB19)/PerCP para análise do status fenotípico de linfócito B e T.

Estes foram diluídos em PBS-W estéril em cada tubo, homogeneizado em vórtex e incubado 30 minutos ao abrigo da luz. Todos os anticorpos foram originários de BD PharmMingen. Adicionados 2mL de PBS-W e homogeneizado em vórtex, as amostras foram centrifugadas a 1300rpm a 18°C por 7 minutos, o sobrenadante, foi vertido e secado delicadamente, homogeneizado em vórtex. Adicionados 200µL de solução fixadora

(MFF). A placa foi identificada com data da realização das culturas e 100.000 eventos/amostra foram adquiridos no citômetro de fluxo LSR Fortessa.

4.2.6. Investigação das citocinas intracitoplasmáticas

Quatro horas antes do término da cultura, foram adicionados 8mL de Brefeldina A-BFA (10mg/mL)(Sigma, #P7651) a cada poço e reincubados por 4 horas adicionais a 37°C em atmosfera úmida com CO₂ a 5%. A seguir as culturas foram tratadas com 2mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Após, as amostras da placa de 48 poços foram centrifugadas a 1400rpm, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram coletadas em tubos de poliestireno de 5mL utilizando pipeta Pasteur de plástico. Foram homogeneizadas com 500µL de PBS 1X gelado. Esse procedimento foi repetido três vezes. Em seguida, foi adicionado 1mL de PBS-W e homogeneizado em vórtex, as amostras foram centrifugadas a 1300rpm, 18°C por 7 minutos, o sobrenadante foi vertido e secado delicadamente e homogeneizado em vórtex.

Posteriormente, foi acrescentado 1,0mL de PBS 1X gelado e 1,0mL de Violet Fluor Reagent Dye [(LIVE/DEAD) Life Technologies,#L34955]. Homogeneizado em vortex e incubado por 15 minutos a 4°C, no escuro. Após a incubação, foi adicionado 1,0mL de PBS-W gelado, homogeneizado em vórtex, centrifugado a 2.000rpm por 5 minutos a 4°C, vertido o sobrenadante, secado delicadamente e homogeneizado em vórtex. As PBMC, foram adicionadas 50µL do coquetel de anticorpos anti-superfície (CD8 PercP + CD19 AlexaFluor 700 + CD3Qdot605 + CD4APCe-Fluor780) diluídos em PBS-W estéril em cada tubo, homogeneizado em vórtex e incubado 30 minutos ao abrigo da luz.

No final da incubação, foram adicionados 2mL de solução de lise 1X, homogeneizando simultaneamente em vórtex e incubado 10 minutos ao abrigo da luz. Após os 10 minutos, foi adicionado 1mL de PBS-W, homogeneizado em vórtex. As amostras foram centrifugadas a 1300 rpm a 18° C por 7 minutos, vertido o sobrenadante e homogeneizado em vórtex. Foram adicionados 500µL de PBS-W e 3mL de PBS-P 0,015 M, pH 7,2, um tampão de permeabilização contendo 0,5% de BSA, 0,1% Azida e 0,5% de Saponina, os tubos foram tampados no segundo estágio e homogeneizados suavemente pelo menos 10 vezes por inversão e incubados 10 minutos ao abrigo da luz.

Após esta incubação, as amostras foram centrifugadas a 1300rpm a 18°C por 7 minutos e vertido o sobrenadante, secado delicadamente, homogeneizado em vórtex. Foram adicionadas as PBMC, 30µL do coquetel de anticorpos anti-citocinas (IFN-γ-Alexa fluor 488 + IL-5-PE + IL-10-APC + TNF-α-PE-Cy7) diluídos em PBS-P estéril em cada tubo,

incubados por 30 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, procedida mais uma lavagem, adicionando 2mL de PBS-P, homogeneizando suavemente em vórtex. as amostras foram centrifugadas a 1300rpm a 18° C por 7 minutos, vertido o sobrenadante e homogeneizado em vórtex. Finalmente, foram adicionados 2 mL de PBS-W, homogeneizado em vórtex, as amostras foram centrifugadas a 1300 rpm a 18° C por 7 minutos, vertido o sobrenadante, secado delicadamente, homogeneizado em vórtex. Foram adicionados 200 µL de solução fixadora (MFF). a placa foi identificada com data da realização das culturas e 100.000 eventos/amostra foram adquiridos no citômetro de fluxo.[133-135]

4.2.7 Investigação de linfócitos T de memória

Para analisar os perfis fenotípicos de células T de memória foram utilizadas as seguintes estratégias por meio do software FlowJo 10.1 (Figura 11). Inicialmente, por análise de gráficos de FSC-A x FSC-H, selecionaram-se os Singlets [células não agrupadas que foram adquiridas uma a uma (Figura 11)].

Em seguida, empregando gráficos de FSC-A x corante Live-Dead, selecionaram-se apenas as células vivas (Figura 11). A partir desta seleção, os linfócitos viáveis foram selecionados em gráficos de FSC-A x SSC-A (Figura 11). FSC (Forward Scatter) mede o tamanho relativo da célula e SSC (Side Scatter) avalia a granulosidade ou complexidade da célula. Como controle interno da aquisição no LSR Fortessa, empregaram-se os parâmetros Time x FSC-A para garantir que as células foram adquiridas em fluxo sem interrupção (Figura 10). Em seguida, empregando gráficos de CD3 x SSC-A, realizamos a seleção da população de linfócitos TCD3⁺ viáveis. Desta seleção, foram definidas as subpopulações de linfócitos TCD4⁺ ou CD8⁺.

Finalmente, a partir da seleção da subpopulação de linfócitos TCD4⁺, foram avaliadas as expressões das moléculas CD45RO e CD27. Desta forma, por meio dos gráficos de CD45RO x CD27, determinaram-se as frequências de: Q1: CD45RO-CD27⁺ (células Naive), Q2: CD45RO⁺CD27⁺ (Células de Memória Central), Q3: CD45RO⁺CD27⁻ (Células de Memória Efetora) e Q4: CD45RO⁻CD27⁻ (Células Efetoras) (Figura 11). Estratégia semelhante foi realizada para análise do perfil de linfócitos TCD8⁺.

4.2.8 Investigação de linfócitos B de memória

Para analisar os perfis fenotípicos de células B de memória foram utilizadas as seguintes estratégias por meio do software FlowJo 10.1 (Figura 12). Inicialmente, por análise de gráficos de FSC-A x FSC-H, selecionaram-se os Singlets. Em seguida, empregando

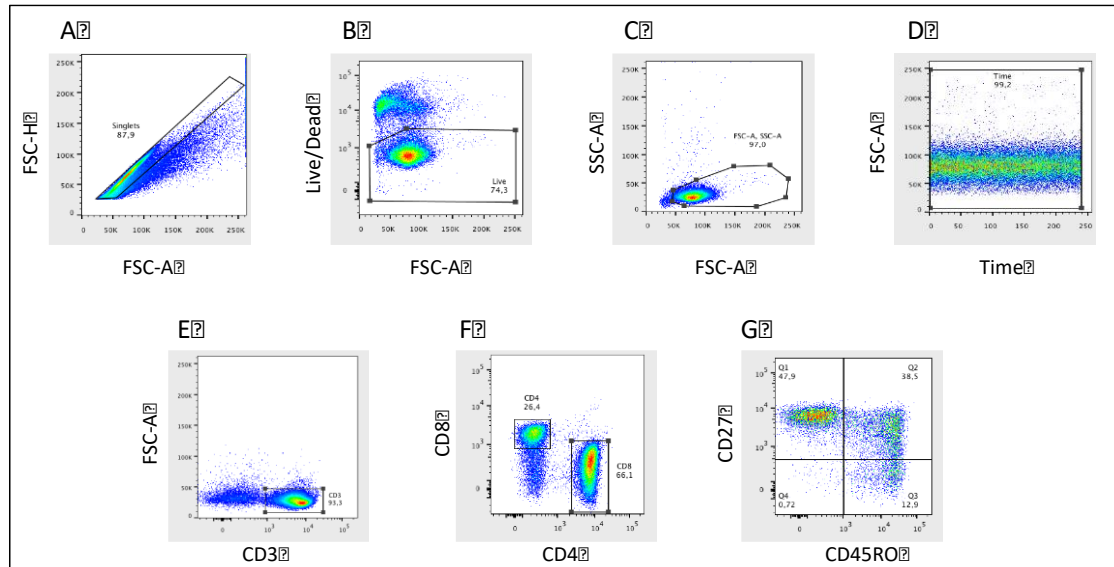
gráficos de FSC-A x corante Live-Dead, selecionaram-se apenas as células vivas. A partir desta seleção, os linfócitos viáveis foram selecionados em gráficos de FSC-A x SSC-A. Como controle interno da aquisição no LSR Fortessa, empregaram-se os parâmetros Time x FSC-A para garantir que as células foram adquiridas em fluxo sem interrupção.

Em seguida, empregando gráficos de CD19 x SSC-A, realizamos a seleção da população de linfócitos B viáveis (Figura 12). Desta seleção, foram definidas as subpopulações de linfócitos B naive, B de memória não clássica e B de memória clássica. Para essa avaliação, foram investigados os parâmetros FITC IgD versus PE CD27, que representam imunoglobulina de superfície IgD, marcada com o fluorocromo FITC e anti-molécula de superfície CD27, marcada com o fluorocromo PE. Assim, os linfócitos B naive (NCD19) foram caracterizados pelo fenótipo CD19⁺CD27-IgD⁺, os linfócitos B de memória não clássica (nCMCD19) foram identificados como células CD19⁺IgD⁺CD27⁺ e os linfócitos B de memória clássica caracterizados pelo fenótipo CD19⁺IgD⁻ CD27⁻.

4.2.9 Estratégia de análise de linfócitos T e B produtores de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras

Empregando o software FlowJo 10.1 no protocolo de identificação de células T e B de produtores de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, inicialmente todas as células foram selecionadas quanto aos parâmetros FSC-A x FSC-H para identificação dos singlets, seguido pela seleção de células adquiridas em fluxo sem interrupção por meio de gráfico de “Time” x FSC-A e finalmente pelo gate de linfócitos totais. A partir desta seleção, os linfócitos totais foram investigados quanto aos parâmetros APC-Cy-7 CD3 versus “Live-dead” e PercP-Cy5.5 CD19 x corante “Live-dead”, para identificação de linfócitos T e B viáveis, respectivamente. Em seguida, as subpopulações de linfócitos CD4 e CD8 foram identificadas e a partir destas e de linfócitos B, foram identificadas as subpopulações produtoras de citocinas IFN- γ , IL-5, IL-10 e TNF- α (Figura 13).

Figura 11: Estratégia de análise do perfil fenotípico em linfócitos T CD4⁺ após cultura *in vitro* de 6 dias de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos controle saudáveis e de indivíduos com AR



(A) seleção de células não agrupadas em gráficos de FSC-A (forward scatter - area) x FSC-H (forward scatter – height) (B) seleção de células vivas em gráficos de FSC-A x corante “Live-Dead” e seleção de células negativas para o fluorocromo “Pacific Blue”; (C) seleção de PBMC viáveis em gráficos de FSC-A (forward scatter) x SSC-A (side scatter); (D) seleção de células adquiridas em fluxo sem interrupção por meio de gráfico de “Time” x FSC-A; (E) seleção de população de linfócitos TCD3⁺ em gráficos de CD3 x SSC-A; (F) seleção de regiões de populações de linfócitos TCD4⁺ ou CD8⁺. A partir da seleção da população de linfócitos TCD4⁺ foram avaliadas as expressões dos marcadores CD45RO e CD27. (G) gráficos de CD45RO x CD27, onde: Q1: CD45RO⁺CD27⁺ (células *Naive*), Q2: CD45RO⁺CD27⁻ (Células de Memória Central), Q3: CD45RO⁺CD27⁺ (Células de Memória Efetora) e Q4: CD45RO⁻CD27⁻ (Células Efetoras).

Figura 12. Estratégia de análise de linfócitos T e B de memória.

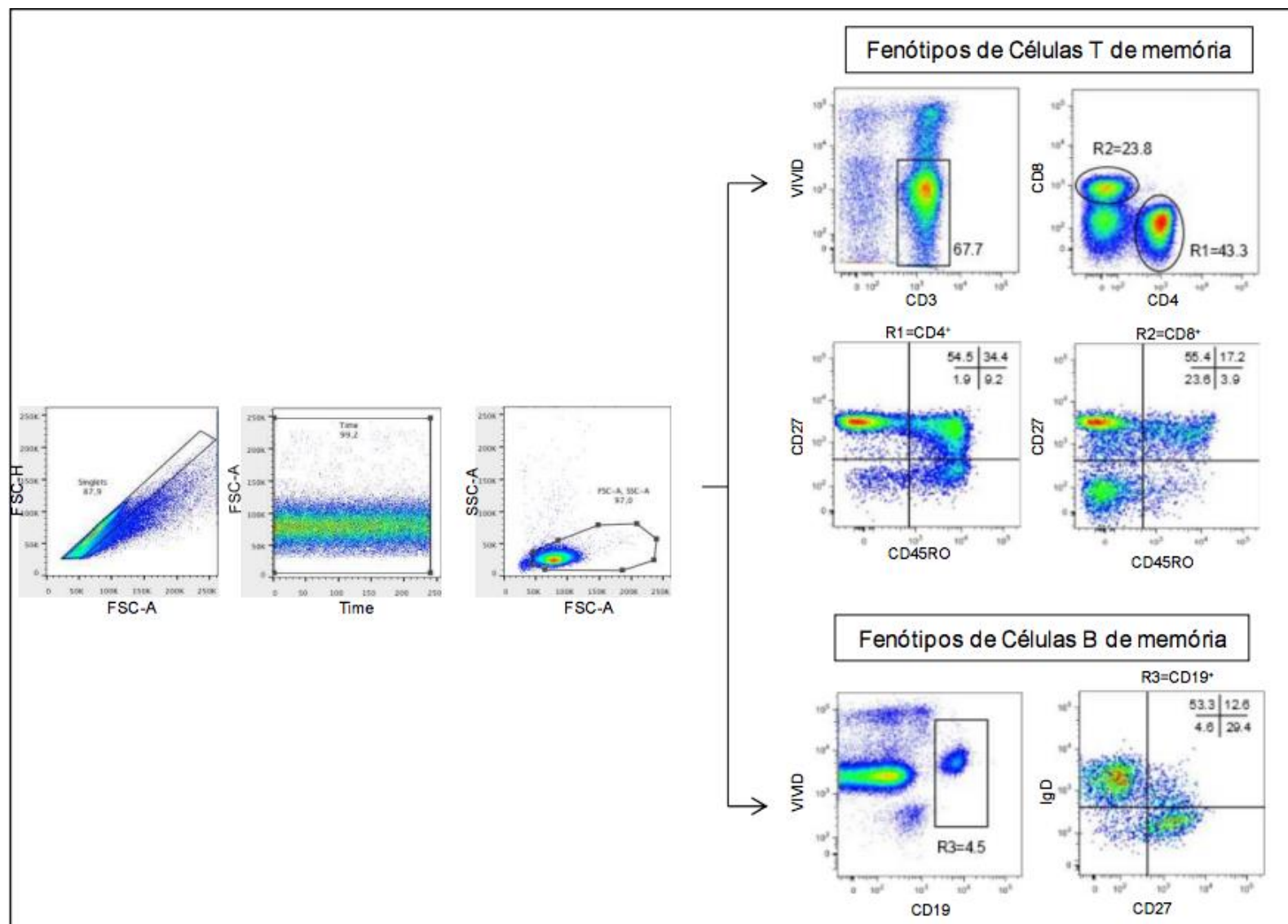
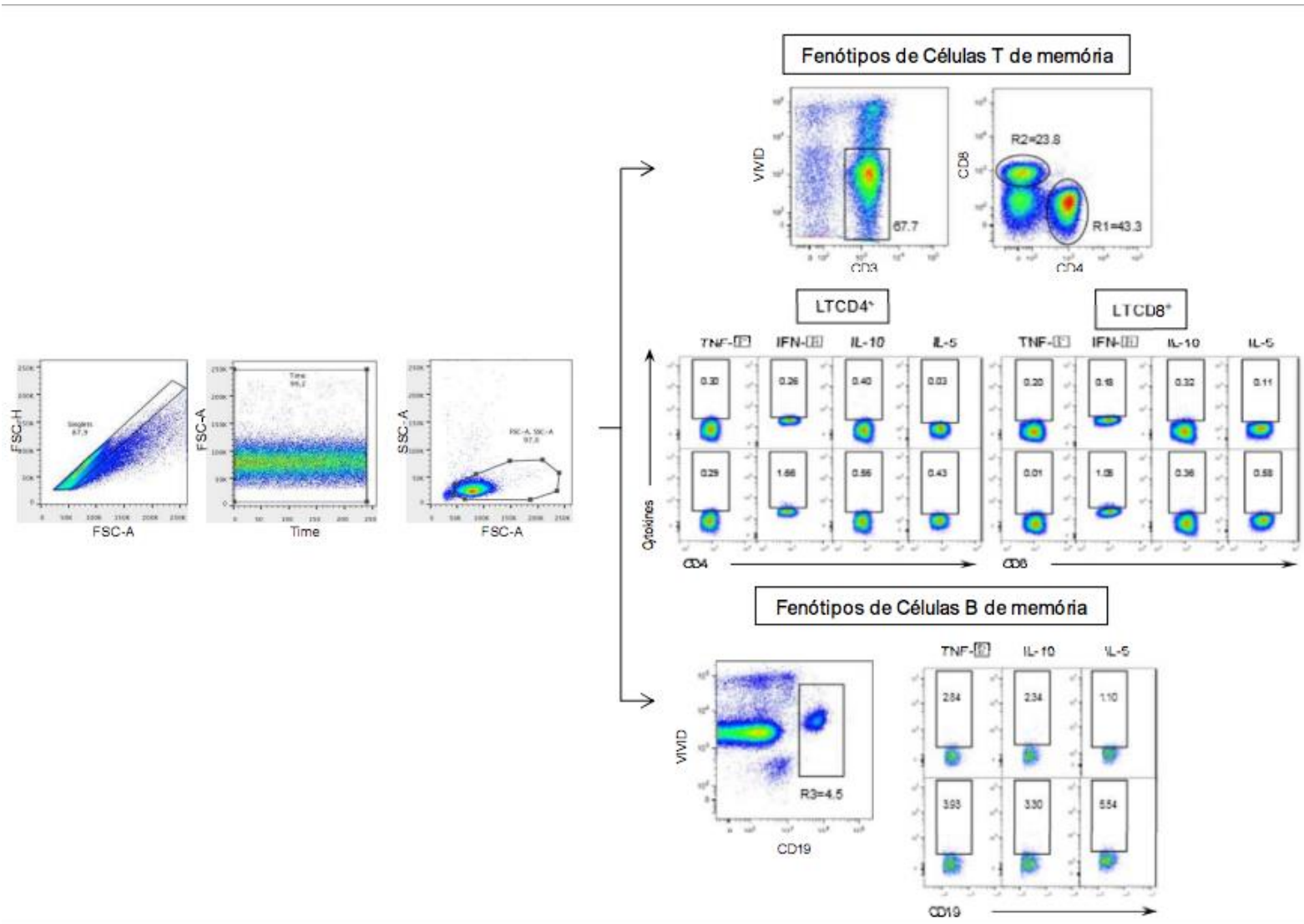


Figura 13. Estrat3gia de an3lise de linf3citos T e B produtores de citocinas.



4.2.10 Análise da imunidade celular

Os subtipos fenotípicos de linfócitos T estudados foram:

- Nãive (NCD4 e NCD8): CD27⁺CD45RO⁻
- Efetora (eEfCD4 e eEfCD8): CD27⁻CD45RO⁻
- Memória Central (CMCD4 e CMCD8): CD27⁺CD45RO⁺
- Memória Efetora (EMCD4 e EMCD8): CD27⁻CD45RO⁺

Em relação aos linfócitos B, os subtipos estudados foram:

- Nãive (NCD19): CD27⁻IgD⁺
- memória não-clássica (nCMCD19): CD27⁺IgD⁺
- memória Clássica (CMCD19): CD27⁺IgD⁻

As células produtoras de citocinas também foram estudadas:

- TNF- α , IFN- γ , IL-10 and IL-5 para linfócitos T
- TNF- α , IL-10 and IL-5 para linfócitos B.

Os resultados foram computados na forma de índice Cultura Estimulada/ Cultura Controle, sendo as frequências das células observadas na Cultura Estimulada divididas pelas frequências das células observadas na Cultura Controle, de cada indivíduo. A caracterização dos padrões fenotípicos e funcionais das PBMC ocorreu após estímulo in vitro do antígeno vacinal da febre amarela. O índice leva em consideração os resultados intrínsecos da cultura controle, servindo como padrão basal para cada indivíduo.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Todos os resultados desse estudo assumiram distribuição não paramétrica. As diferenças estatisticamente significativas serão consideradas quando $p \leq 0,05$.

Neste estudo foram utilizadas as seguintes estratégias de análise dos dados: estatística convencional, análise de assinaturas de biomarcadores, confecção dos diagramas de Venn e sobreposição de curvas de assinaturas.

5.1 ESTATÍSTICA CONVENCIONAL

Estatística convencional foi utilizada para análise comparativa com os grupos referencia NV (dia0) e PV (30-45dias). As médias de cada grupo de estudo (CONT, MMCDsce MMCDsc+b) foi comparada ao intervalo de confiança de 95% dos grupos referencia NV (dia0) e PV (30-45dias). As diferenças das médias fora do intervalo de confiança 95% foram consideradas significativas ($p < 0,05$) e marcadas nas figuras com as letras " a" e "b". A letra 'a' refere-se à diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NV (dia0) e a letra 'b' refere-se à diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PV (30-45 dias).

Em relação aos dados de dosagem de níveis de anticorpos neutralizantes pelo PRNT, cada grupo de estudo foi comparado aos grupos referencia PV (30-45 dias) e NV (dia0) por meio do teste de Mann-Whitney. A letra 'a' refere-se à diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NV (dia0) e a letra 'b' refere-se à diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PV (30-45 dias). Para avaliar a taxa de soropositividade do PRNT foi feita uma comparação da proporção de indivíduos soropositivos (PRNT >1:50) em cada grupo, comparado ao grupo PV (30-45 dias). Não houve diferença significativa entre os grupos, porém valores <80% foram considerados críticos, com base na expectativa de taxa de proteção esperada para uma população adulta vacinada, que é acima de 95%.

Em relação às variáveis qualitativas (nível de atividade de doença) foi utilizado o teste do qui-quadrado para avaliar diferenças entre os grupos.

5.2. CURVAS DE ASSINATURAS DE BIOMARCADORES

As curvas de assinaturas de biomarcadores foram utilizadas para traçar o perfil de cada grupo e observar suas alterações de acordo com o tempo pós-vacinação.

Foram calculadas da seguinte forma: inicialmente foi calculada a mediana global para cada marcador fenotípico e funcional (NCD4; NCD8; eEfCD4; eEfCD8; EMCD4; EMCD8; CMCD4; CMCD8; NCD19; nCMCD19; CMCD19; TNFCD4; TNFCD8; TNFCD19; IFNCD4; IFNCD8; IL10CD8; IL10CD4; IL10CD19; IL5CD19; IL5CD4; IL5CD8). A mediana global é o valor da mediana dos valores do índice CE/CC de todos os grupos [NV (dia 0), PV (30-45dias), CONT, MMCDsc e MMCDsc+b].

Após a obtenção da mediana global, os valores do índice CE/CC de cada indivíduo de cada grupo [NV(dia 0), PV(30-45dias), CONT[1-5) anos, CONT[5-10) anos, CONT \geq 10 anos, MMCDsc[1-5) anos, MMCDsc[5-10) anos, MMCDsc \geq 10 anos, MMCDsc+b[1-5) anos, MMCDsc+b[5-10) anos e MMCDsc+b \geq 10 anos] foram comparados à mediana global. Os grupos que possuíam mais de 50% dos indivíduos com valores superiores à mediana global eram considerados HIGH, altos produtores daquele marcador específico e aqueles que possuíam menos de 50% dos indivíduos com valores superiores à mediana global eram considerados LOW, baixos produtores. A mediana global da população de estudo foi o valor utilizado como “cut-off” para definição de HIGH ou LOW.

As curvas de assinatura dos grupos NV (dia0) e PV (30-45dias) foram utilizadas como referência e estas foram sobrepostas às curvas dos outros grupos para análise e comparação.

Os biomarcadores que obtiveram > de 50% dos valores superiores à mediana global (HIGH) no grupo PV (30-45dias) e que foram caracterizados como LOW no grupo NV (dia0) foram identificados como os marcadores associados à vacina antiamarílica 17DD nesta população.

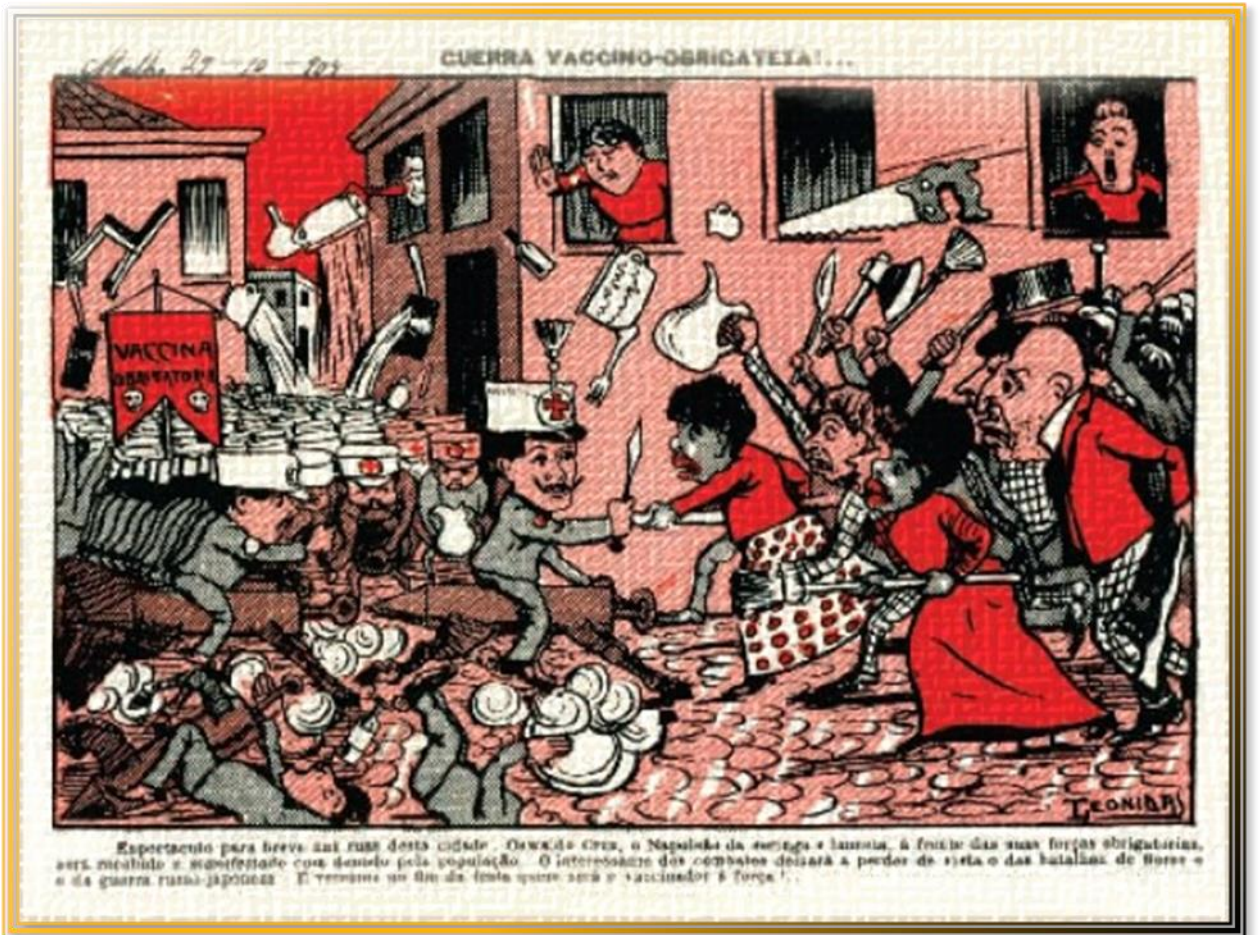
A curva de assinaturas, ao promover uma técnica de aproximação binária entre a mediana de cada biomarcador e a porcentagem de indivíduos com altos valores em PV (30-45dias), permite a identificação de sutis diferenças mesmo quando a diferença dos valores absolutos é pequena.

A metodologia da curva de assinaturas de biomarcadores foi realizada de maneira semelhante em estudos anteriores. [72, 135, 136]

5.3. DIAGRAMAS DE VENN

Os diagramas de Venn são utilizados para ilustrar as interações entre múltiplos conjuntos de dados.[137]São curvas fechadas contidas em um plano sendo que o interior dessas curvas representa o total de elementos do conjunto. São ferramentas da bioinformática que possibilitam visualizar as intersecções entre grupos, ou seja, o que há de comum entre vários conjuntos e ainda, o que é exclusivo de um determinado conjunto de dados.

A confecção dos diagramas de Venn deste estudo foi realizada por meio do site <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. O grupo de biomarcadores identificados no grupo PV (30-45dias) como associado à vacina 17DD (aqueles que apresentavam mais de 50% das amostras com valores acima da mediana global) aparecem em negrito. Esses atributos foram empregados para análises comparativas entre esses biomarcadores por meio de curvas de assinatura sobrepostas nas quais o percentil 50 definiu diferenças significativas para cada grupo de estudo.



Charge d'*O Malho* que representava a fúria da população do Rio de Janeiro contra a vacinação obrigatória.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

O grupo de AR final compôs-se de 121 indivíduos, sendo 113 mulheres e 9 homens, com idades entre 23-86 anos, subdivididos em 2 grupos em relação ao uso de MMCD sintéticos ou biológicos. O primeiro grupo, a quem chamaremos de **MMCDsc**, era composto por 73 indivíduos em uso de MMCD sintéticos. O segundo grupo, **MMCDsc+b**, era composto por 48 indivíduos que estavam em tratamento com MMCD sintéticos associados a biológicos.

O grupo controle incluiu 226 voluntários hígidos, sendo 121 homens e 59 mulheres, com idades entre 18-82 anos. O grupo controle foi subdividido em 5 subgrupos com 2 grupos pareados:

- indivíduos não vacinados – NV (dia0); n=46. A coleta de sangue foi realizada antes da aplicação da vacina.
- indivíduos primovacinados – PV (dias 30-45); n=46. A coleta de sangue foi realizada após 30-45 dias da aplicação da vacina.

Os grupos NV (dia 0) e PV (dias 30-45) foram pareados. A faixa etária foi de 18-19 anos.

O grupo controle também foi composto de 3 grupos de voluntários hígidos que foram segregados de acordo com o tempo pós-vacinação:

- CONT [1-5] anos n= 40; faixa etária entre 20-70 anos;
- CONT (5-10] anos n= 38; faixa etária entre 29-83 anos;
- CONT \geq 10 anos n= 56; faixa etária entre 27-82 anos.

O grupo controle incluiu 226 voluntários hígidos, sendo 121 homens e 59 mulheres, com idades entre 18-82 anos. O grupo controle foi subdividido em 5 subgrupos com 2 grupos pareados:

- indivíduos não vacinados – NV (dia0); n=46. A coleta de sangue foi realizada antes da aplicação da vacina.
- indivíduos primovacinados – PV (dias 30-45); n=46. A coleta de sangue foi realizada após 30-45 dias da aplicação da vacina.

Os grupos NV (dia 0) e PV (dias 30-45) foram pareados. A faixa etária foi de 18-19 anos.

O grupo controle também foi composto de 3 grupos de voluntários hígidos que foram segregados de acordo com o tempo pós-vacinação:

- CONT [1-5) anos n= 40; faixa etária entre 20-70 anos;
- CONT (5-10] anos n= 38; faixa etária entre 29-83 anos;
- CONT ≥ 10 anos n= 56; faixa etária entre 27-82 anos.

Os dados demográficos, clínicos e o detalhamento da terapia imunomoduladora encontram-se registrados na tabela 2.

Os grupos de estudo de AR [MMCDsc[1-5) anos, MMCDsc[5-10) anos, MMCDsc ≥ 10 anos, MMCDsc+b[1-5) anos, MMCDsc+b[5-10) anos e MMCDsc+b ≥ 10 anos foram analisados em relação ao nível de atividade de doença no momento da coleta sanguínea. Os indivíduos foram categorizados em remissão, atividade leve, moderada ou alta de doença, de acordo com os índices compostos de atividade de doença. Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos ($p=0,2026$). Vide figura 14.

6.1 DECLÍNIO PRECOCE DOS ANTICORPOS NEUTRALIZANTES NO GRUPO DE TERAPIA IMUNOMODULADORA COMBINADA SINTÉTICA E BIOLÓGICA (MMCDsc+b)

A análise dos níveis de anticorpos neutralizantes dosados pelo PRNT está ilustrada na figura 15. Os dados foram reportados como níveis de PRNT e proporção de soropositividade. Define-se soropositivo aquela amostra cuja diluição sérica $> 1:50$. Os resultados demonstram uma redução dos níveis de PRNT ao longo do tempo em todos os grupos (CONT, MMCDsc e MMCDsc+b) comparados ao grupo referência PV (30-45 dias) (Figura 15A). O índice de soropositividade alcança níveis críticos no grupo CONT (71%) e MMCDsc (72%) após 10 anos de vacinação (Figura 15B). Contudo, o grupo MMCDsc+b apresenta declínio precoce do índice de soropositividade, atingindo níveis críticos de PRNT (76%) entre 5 e 9 anos de vacinação. (Figura 15C).

Tabela 2. Dados demográficos, registros clínicos e terapia imunomodulatória em pacientes com AR

| Parâmetros | | MMCDsc n=73 | | | MMCDsc+b n=48 | | |
|-----------------------|----------------------------|--------------------|------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------|
| | | [1-5] anos n=18 | [5-10) anos n=37 | ≥10anos n=18 | [1-5) anosn=10 | [5-10) anos n=25 | ≥10anos n=13 |
| Sexo (F/M) | | 17/1 | 32/2 | 15/3 | 9/1 | 23/2 | 13/0 |
| Idade (anos) | | 58 (31-78) | 53 (26-86) | 49 (23-81) | 55 (28-75) | 60 (40-82) | 54 (29-80) |
| Duração da AR (meses) | | 99 (12-432) | 114 (12-348) | 84 (12-480) | 210 (96-298) | 144 (72-370) | 168 (96-288) |
| Atividade de doença | Remissão | 9 (60%) | 15 (45,4%) | 5 (29,4%) | 3 (30%) | 7 (30,4%) | 2 (15,4%) |
| | Baixa | 5 (33%) | 8 (24,2%) | 6 (35,5%) | 5 (50%) | 10 (43,3%) | 3 (23%) |
| | Moderada | 0 | 8 (24,2%) | 3 (17,6%) | 2 (20%) | 5 (21,7%) | 6 (46,1%) |
| | Alta | 1 (6,7%) | 2 (6,1%) | 3 (17,6%) | 0 | 1 (4,3%) | 2 (15,4%) |
| csDMARD dose | CYC (3-5mg/kg/dia) | - | - | - | - | - | 200mg (01/13) |
| | MTX (2.5-25mg/sem) | 17mg (14/18) | 16mg (35/37) | 18mg (12/18) | 23mg (05/10) | 17mg (14/25) | 17mg (04-13) |
| | LEF (dose padrão/dia) | 20mg (06/18) | 20mg (19/37) | 20mg (09/18) | 20mg (05/10) | 20mg (12/25) | 20mg (06/13) |
| | SSZ (1,000-3,000mg/dia) | 1500mg (02/18) | - | 2300mg (03/18) | - | 1000mg (02/25) | 1200mg (05/13) |
| | AML (150-400mg/dia) | 275mg (04/18) | 340mg (05/37) | - | - | 150mg (01/25) | 275mg (02/13) |
| | AZA (2-3mg/kg/dia) | - | - | - | 150mg (01/10) | - | - |
| bDMARD dose | RTX (dose padrão 6/6m) | - | - | - | 1000mg (01/10) | 1000mg (02/25) | 1000mg (01/13) |
| | IFX (3-5mg/kg/8/8 sem) | - | - | - | 300mg (01/10) | 233mg (06/25) | - |

| | | | | | | | |
|--|-------------------------------------|---|---|---|------------------|------------------|------------------|
| | TCZ (8mg/kg/mês) | - | - | - | - | 496mg (05/25) | 480mg (02/13) |
| | ABT (10mg/kg/mês) | - | - | - | - | 750mg (03/25) | 750mg (01/13) |
| | ADA (dose padrão/ 14/14d) | - | - | - | 40mg (01/10) | 40mg (02/25) | 40mg (01/13) |
| | CTZ (dose padrão/ mês) | - | - | - | 400mg (02/10) | - | 400mg (01/13) |
| | ETN (dose padrão / sem) | - | - | - | 50mg (05/10) | 50mg (05/25) | 50mg (04/13) |
| | GOL (dose padrão /mês) | - | - | - | - | 50mg (02/25) | 50mg (03/13) |

| | | | | | | | |
|--|------------------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|----------------|
| | PDN (2.5-40mg/dia) | 7,5mg (04/18) | 13,6mg (06/37) | 8,2mg (07/18) | 6,7mg (03/10) | 10,8mg (06/25) | 7mg (05/13) |
|--|------------------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|----------------|

MMCDsc= medicações modificadoras do curso da doença sintéticas convencionais; MMCDsc+b = medicações modificadoras do curso da doença sintéticas convencionais combinado com medicações biológicas; CG = Glucocorticóides; F = Feminino; M = Masculino; Idade expresso como mediana (mínimo-máximo); Duração da doença em meses expresso como mediana (mínimo-máximo); As médias das doses das medicações foram calculadas para cada grupo., entre parênteses está o número de indivíduos que estava em uso da medicação. MTX = Metotrexato; LEF = Leflunomida; SSZ =Sulfassalazina; AML = drogas antimaláricas (hidroxicloroquina e difostato de cloroquina); AZA = Azatioprina; CYC = Ciclosporina; ADA = adalimumabe; CTZ = Certolizumabe; ETN = Etanercepte; GOL = Golimumabe; IFX= Infliximabe; TCZ =Tocilizumabe; ABT = Abatacepte; RTX = Rituximabe; PDN = Prednisona.

Figura14. Grupos de AR e atividade de doença mensurada pelos índices compostos de atividade de doença.

p=0,2026

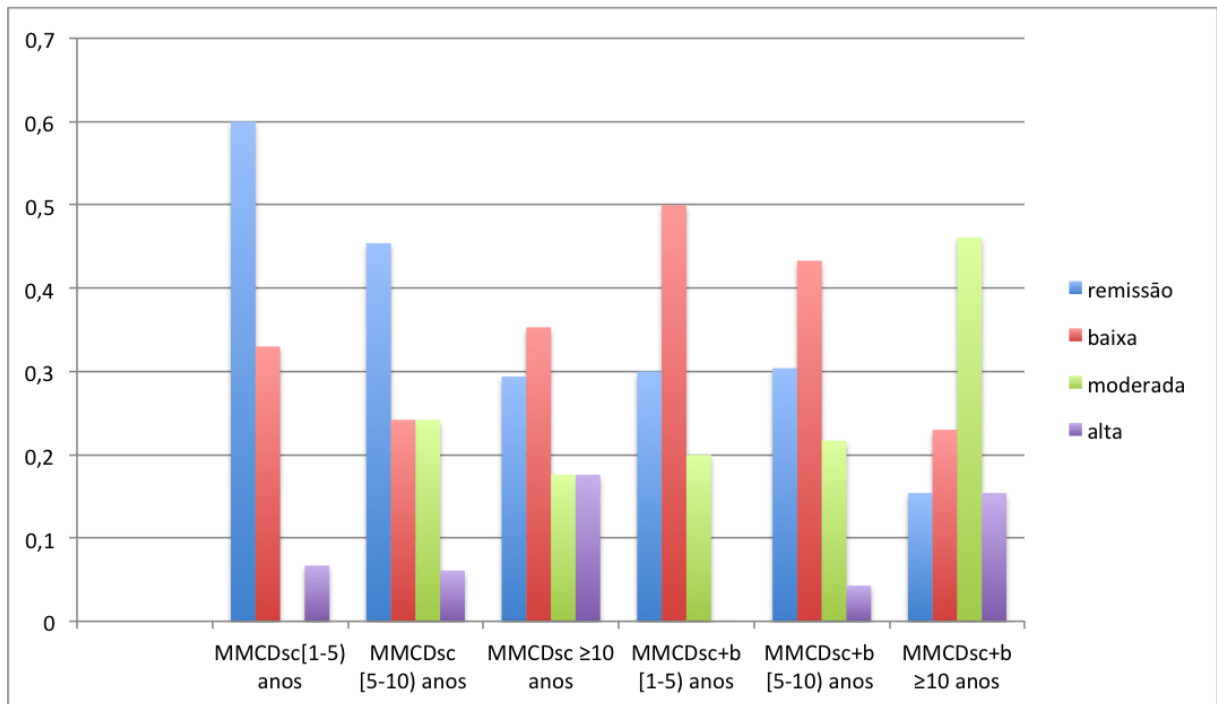


Figura 15. Dosagem dos níveis de anticorpos neutralizantes em pacientes submetidos à terapia imunomoduladora após vacinação com 17DD.

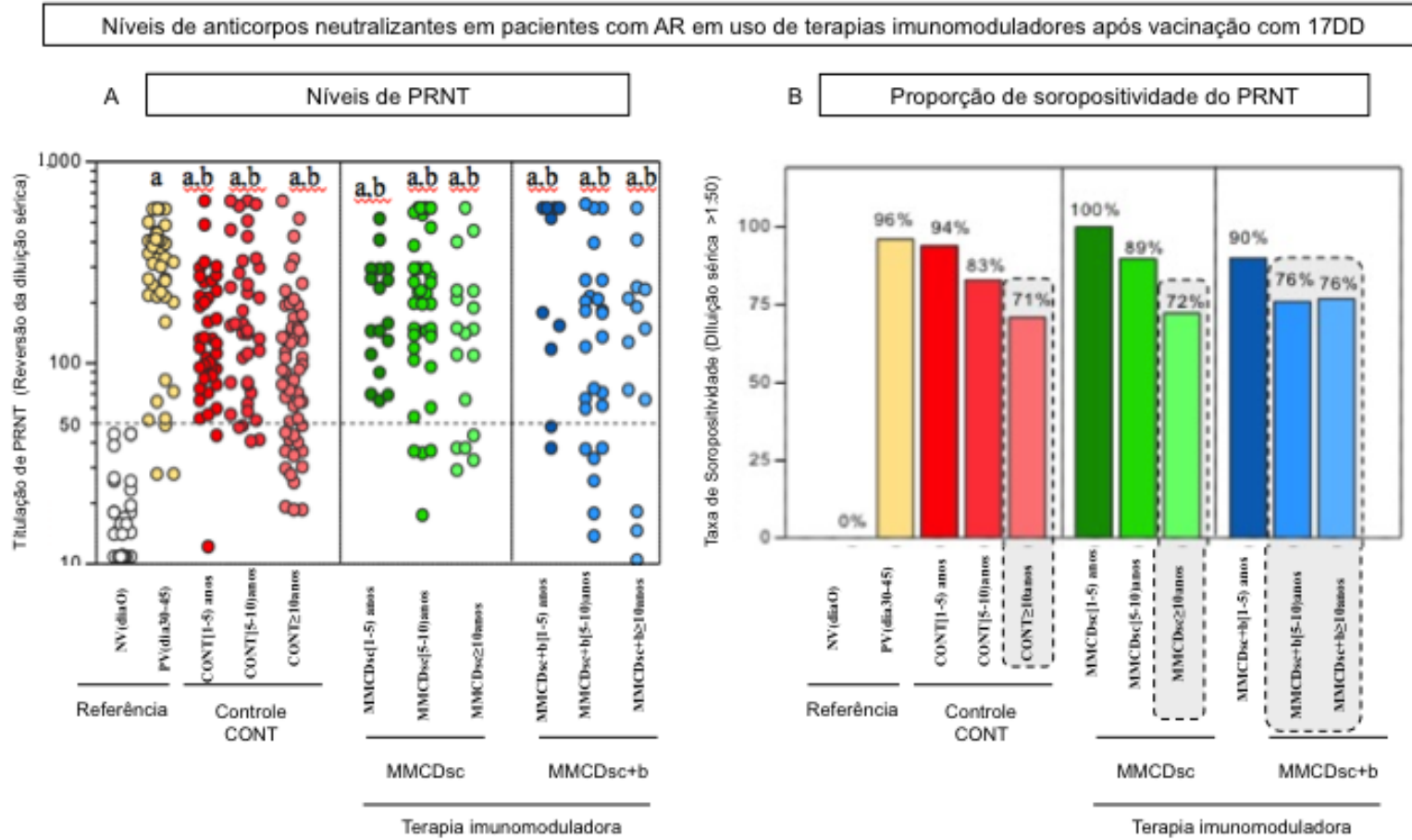


Figura 15. Dosagem dos níveis de anticorpos neutralizantes em pacientes submetidos à terapia imunomoduladora após vacinação com 17DD. PRNT foi realizado conforme descrito previamente na seção de Métodos. Os dados obtidos foram relatados como níveis de PRNT (A) e proporção de soropositividade (diluição sérica >1:50) (B) nos grupos referencia [NV(dia0) e PV(30-45dias)] e nos grupos de estudo CONT[1-5) anos, CONT[5-10) anos, CONT \geq 10 anos, MMCDsc[1-5) anos, MMCDsc[5-10) anos, MMCDsc \geq 10 anos, MMCDsc+b[1-5) anos, MMCDsc+b[5-10) anos e MMCDsc+b \geq 10 anos,. Diferenças significativas nos níveis de PRNT em relação a NV (dia0) e PV (30-45dias) foram marcadas com as letras “a” e “b” respectivamente. Taxa de soropositividade abaixo de 80% foi considerada crítica e foi realçada na figura com linha tracejada.

6.2 INDIVÍDUOS COM AR TRATADOS COM TERAPIA IMUNOMODULADORA APRESENTAM PERFIL FENOTÍPICO DISTINTO DE CÉLULAS DE MEMÓRIA

O perfil fenotípico de biomarcadores de células de memória específicas contra o antígeno amarelo é mostrado na figura 16. Os resultados mostram que os indivíduos com AR que estão sob tratamento imunomodulador (MMCDsc + MMCDsc+b) apresentam um padrão distinto do grupo controle, com níveis aumentados de eEfCD4 e reduzidos de CMCD4, NCD19 e nCMCD19.

O grupo MMCDsc+b, em particular, apresenta uma redução precoce dos níveis de EMCD4, CMCD8 e EMCD8, observado entre 1-5 anos pós-vacinação, quando comparado ao grupo CONT e MMCDsc (Figura 16).

Figura 16. Biomarcadores fenotípicos de memória em pacientes em uso de terapia imunomoduladora após vacinação com 17DD

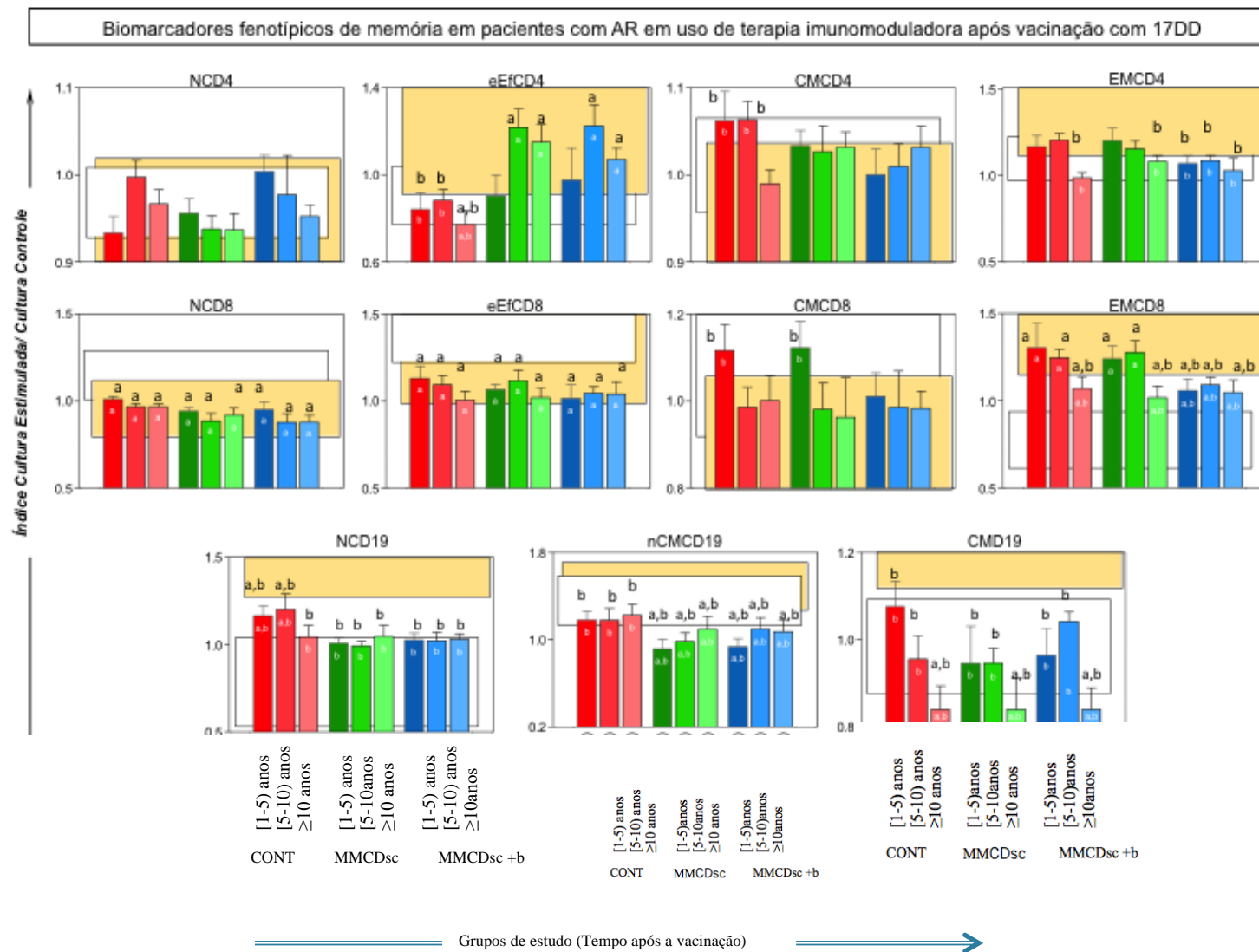


Figura 16. Biomarcadores fenotípicos de memória em pacientes em uso de terapia imunomoduladora após vacinação com 17DD. Análise de PBMC por meio de citometria de fluxo foi realizada para avaliar biomarcadores de memória vacinal. Os subtipos de linfócitos T analisados foram: Naïve/(NCD4 e NCD8)/CD27⁺CD45RO⁻; células efetoras /(eEfCD4 e eEfCD8)/CD27⁻CD45RO⁻; Memória central /(CMCD4 e CMCD8)/CD27⁺CD45RO⁺; Memória Efetora /(EMCD4 e EMCD8)/CD27⁻CD45RO⁺, assim como os seguintes subtipos de linfócitos B: Naïve/(NCD19)/CD27-IgD⁺; memória não-clássica /(nCMCD19)/CD27⁺IgD⁺; Memória Clássica/(CMCD19)/CD27⁺IgD⁻. Os resultados foram expressos em forma de índice CE/ CC (cultura estimulada/ cultura controle) conforme descrito em Métodos. Análises comparativas com os grupos referencia NV(dia 0) e PV(30-45dias) foram realizadas comparando a média de cada grupo CONT[1-5) anos, CONT[5-10)anos, CONT≥10 anos,MMCDsc[1-5) anos, MMCDsc[5-10) anos,, MMCDsc≥10 anos , MMCDsc+b[1-5) anosMMCDsc+b[5-10) anos, MMCDsc+b ≥10 anos com o intervalo de confiança (IC) 95% dos grupos referencia [NV(dia 0) - retângulos brancos] e [PV(30-45dias)- retângulos amarelos]. Diferenças significativas em relação ao grupo NV (dia 0) foram marcadas com as letras ‘a’ A letra ‘b’ representa diferenças significativas em relação ao grupo PV (30-45dias). As colunas representam a média de cada grupo com seu respectivo erro padrão.

6.3. INDIVÍDUOS COM AR EM USO DE TERAPIA IMUNOMODULADORA COMBINADA SINTÉTICA E BIOLÓGICA APRESENTAM DECLÍNIO PRECOCE DOS MARCADORES FUNCIONAIS ESPECÍFICOS PARA O ANTÍGENO DA FEBRE AMARELA.

O perfil funcional de biomarcadores de memória específicos para o antígeno da febre amarela é mostrado na figura 17. Nesse caso, os grupos de estudo de AR, tanto o MMCDsc como o MMCDsc+b, apresentam um perfil distinto do grupo controle, com níveis reduzidos de IL-5CD8 e IL-10CD19. De maneira semelhante ao que se vê no item 6.2, o grupo em uso de terapia combinada sintética e biológica (MMCDsc+b) apresenta um declínio precoce (1-5 anos) dos biomarcadores IFNCD4, IFNCD8, TNFCD4, TNFCD19 e IL-5CD4 comparado aos grupos CONT e MMCDsc.

Figura 17. Perfil de biomarcadores funcionais em indivíduos sob uso de terapia imunomoduladora após vacinação com 17DD

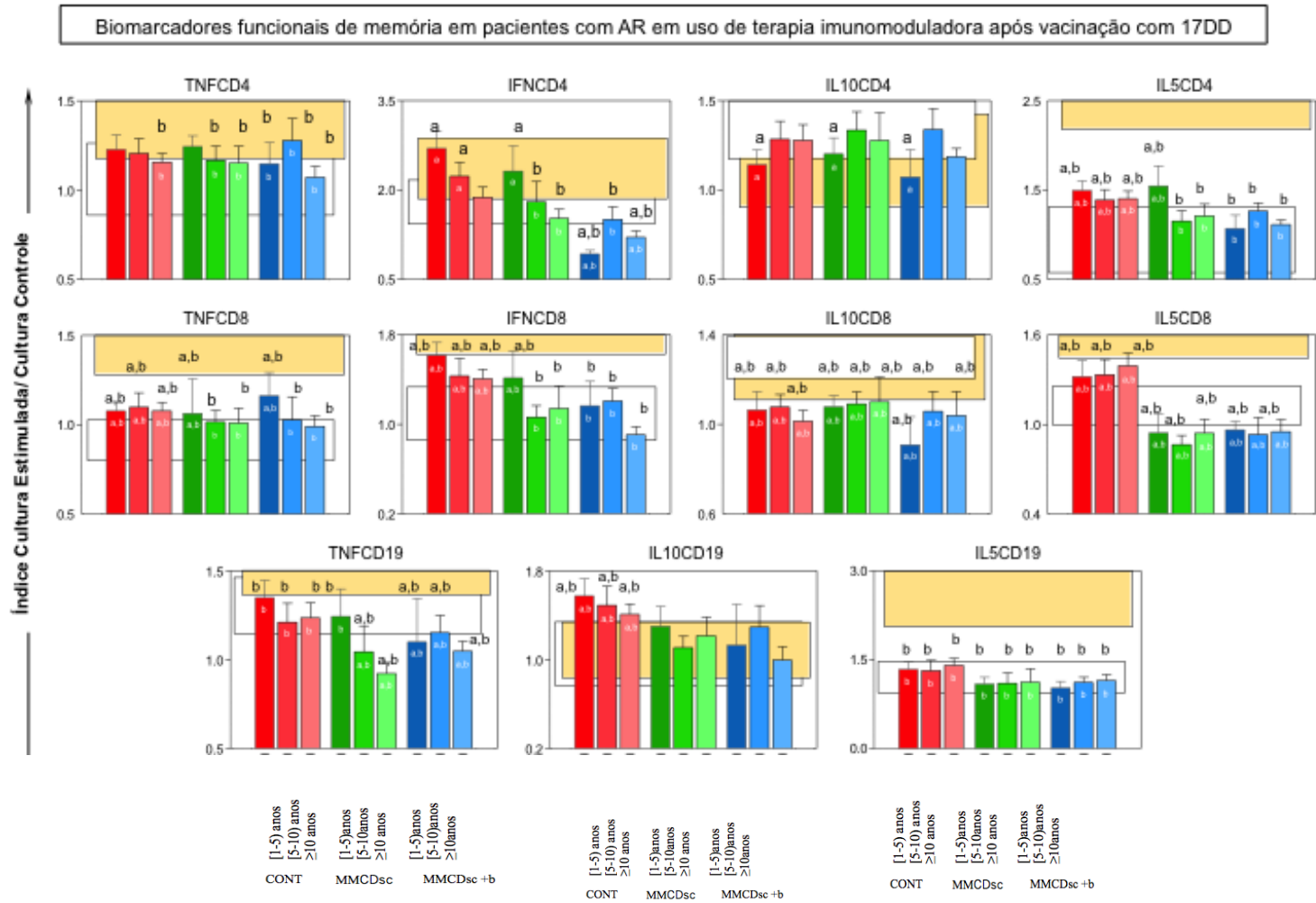


Figura 17. Análise de citocinas intracitoplasmáticas por meio de citometria de fluxo foi realizada para avaliar biomarcadores funcionais de memória vacinal. A frequência de linfócitos T produtores de $TNF\alpha$, $IFN-\gamma$, IL-10 e IL-5 foi quantificada assim como a frequência de linfócitos B produtores de $TNF\alpha$, IL-10 e IL-5. Os resultados foram expressos em forma de índice CE/CC (cultura estimulada/cultura controle) conforme descrito em Métodos. Análises comparativas com os grupos referencia NV(dia 0) e PV(30-45dias) foram realizadas comparando a média de cada grupo CONT[1-5) anos, CONT[5-10) anos, $CONT\geq 10$ anos, MMCDsc[1-5) anos, MMCDsc[5-10) anos, $MMCDsc\geq 10$ anos, MMCDsc+b[1-5) anos, MMCDsc+b[5-10) anos, $MMCDsc+b\geq 10$ anos com o intervalo de confiança (IC) 95% dos grupos referencia [NV(dia 0) - retângulos brancos] e [PV(30-45dias)- retângulos amarelos]. Diferenças significativas em relação ao grupo NV (dia 0) foram marcadas com as letras 'a' A letra 'b' representa diferenças significativas em relação ao grupo PV (30-45dias). As colunas representam a média de cada grupo com seu respectivo erro padrão.

6.4. CURVAS DE ASSINATURAS DE BIOMARCADORES DE MEMÓRIA ESPECÍFICAS PARA O ANTÍGENO DA FEBRE AMARELA EM INDIVÍDUOS COM AR EM TERAPIA IMUNOMODULADORA.

A curva de assinatura de biomarcadores foi proposta para melhor caracterização e visualização do perfil de marcadores imunológicos de indivíduos vacinados com 17DD. Permite a identificação dos biomarcadores mais relevantes dentro dessa população. Já foi utilizada em trabalhos com metodologia semelhante. [72]

As curvas de assinaturas dos grupos PV (30-45dias) e NV (dia0) foram utilizadas como referencia a fim de se identificar aqueles biomarcadores que se expressam em maior intensidade no período logo após a vacinação (Figura 18A). A partir disso, foram construídos diagramas de Venn (Figura 18B) para selecionar um conjunto de biomarcadores específicos para o antígeno da febre amarela. Esse conjunto de biomarcadores servirá para monitorar as curvas de assinatura de cada grupo (CONT, MMCDsce MMCDsc+b) no decorrer do tempo pós-vacinação.

Na curva de assinatura do grupo PV (30-45dias), um conjunto de nove biomarcadores fenotípicos e funcionais se destacaram de forma seletiva: EMCD4, EMCD8, CMCD19, IFNCD4, TNFCD4, IL-5CD4, IFNCD8, TNFCD8 and IL-5CD8 (Figura 18B). Esses biomarcadores foram empregados para comparação com as curvas de assinaturas de biomarcadores dos demais grupos (CONT, MMCDsce MMCDsc+b), de acordo com o período pós-vacinação: [1-5] anos (Figura 19A), [5-10] anos (Figura 19B) e ≥ 10 anos (Figura 19C). Dentre esses nove biomarcadores, EMCD8 e IL-5CD4 merecem destaque pois foram descritos como os dois biomarcadores mais indicados para avaliar a memória imunológica da vacina 17DD. [136]

Os resultados mostram que os grupos CONT e MMCDsc apresentam um declínio progressivo dos biomarcadores acima do percentil 50, atingindo um nível crítico com ausência de EMCD8 10 anos pós-vacinação. Por sua vez, o grupo MMCDsc+b apresenta redução dos biomarcadores com ausência de EMCD8 precocemente, 1-5 anos pós-vacinação.

Os diagramas de Venn foram construídos com o objetivo de facilitar a visualização da intersecção entre os grupos. Por meio deles, verifica-se que os indivíduos com AR em terapia imunomoduladora combinada (MMCDsc+b) não compartilham os principais biomarcadores (EMCD8 e IL-5CD4) com o grupo PV (dia30-45). Os grupos CONT e MMCDsc apresentam níveis relevantes e sustentados de EMCD8 até 5-10 anos pós-vacinação, com importante

redução após 10 anos. Entretanto, o grupo MMCDsc+b apresenta uma perda prematura dos principais biomarcadores no período de 1-5 anos pós-vacinação (figura 20).

Figura 18. Curvas de assinaturas de biomarcadores de indivíduos saudáveis antes e após vacinação com 17DD.

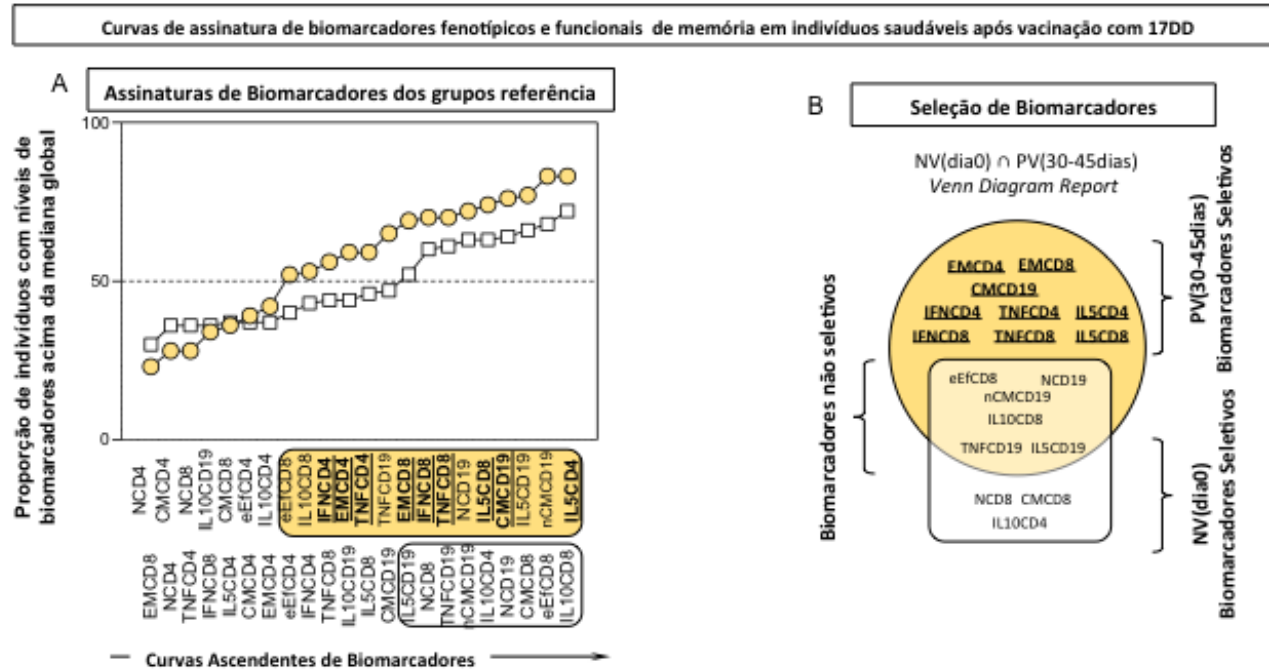


Figura 18. A descrição do processo de confecção das curvas de assinatura está na seção Métodos. (A) As curvas de assinatura de biomarcadores de NV (dia0) [quadrados brancos] e PV (30-45dias) [círculos amarelos] foram consideradas referencias e sobrepostas. Aqueles biomarcadores em que mais de 50% apresentava valor superior ao cut-off, foram selecionados e identificados como induzidos pela vacina 17DD. (B) Diagramas de Venn foram utilizados para visualizar o conjunto de biomarcadores presentes de forma exclusiva em PV (30-45dias). Este conjunto representa os biomarcadores induzidos pela vacinação 17DD, foram realçados em negrito e selecionados para futura comparação com os demais grupos.

Figura 19. Curvas de assinaturas de biomarcadores fenotípicos e funcionais de memória em indivíduos com AR em uso de terapia imunomoduladora

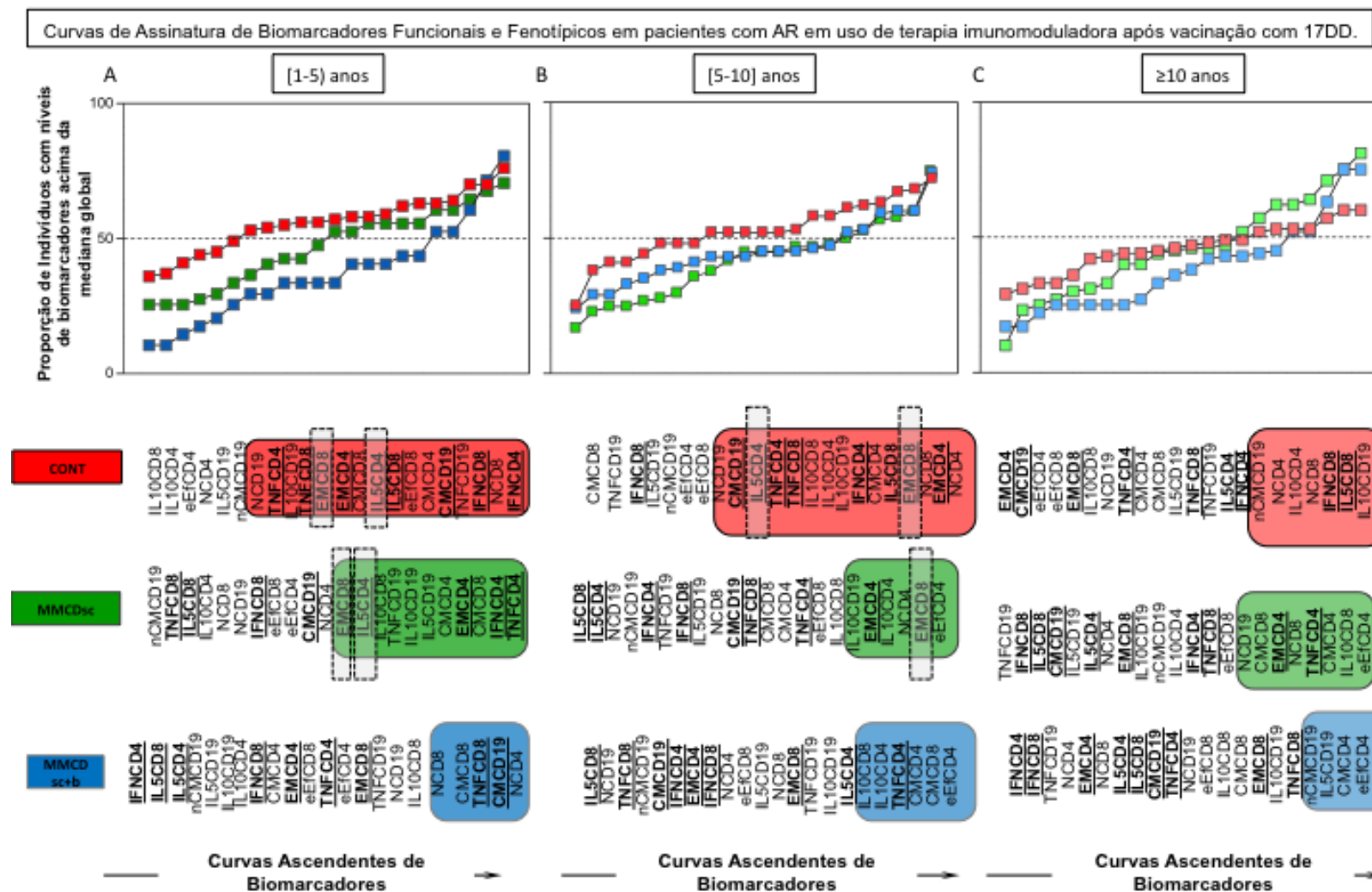


Figura 19. Curvas de assinatura de biomarcadores fenotípicos e funcionais de memória em indivíduos com AR em uso de terapia imunomoduladora. Curvas de assinatura de biomarcadores dos grupos CONT (quadrados vermelhos), MMCDsc (quadrados verdes) e MMCDsc+b (quadrados azuis) foram confeccionadas e sobrepostas nos diversos tempos pós-vacina: (A) [1-5) anos, (B) [5-10) anos e (C) ≥ 10 anos. Os marcadores acima do percentil 50 foram representados dentro dos retângulos coloridos respectivamente: CONT (retângulos vermelhos), MMCDsc (retângulos verdes) e MMCDsc+b (retângulos azuis). O conjunto de nove biomarcadores fenotípicos e funcionais (EMCD4; EMCD8; CMCD19; IFNCD4; TNFCD4; IL-5CD4; IFNCD8; TNFCD8 e IL-5CD8) selecionados para análise comparativa foram grifados em negrito. Atenção especial foi concedida a EMCD8 e IL5-CD4 (em pontilhado), previamente relatados como mais indicados para monitorar a memória imunológica da vacina 17DD[136].

Figura 20. Diagramas de Venn de biomarcadores fenotípicos e funcionais de memória em indivíduos com AR em uso de terapia imunomoduladora

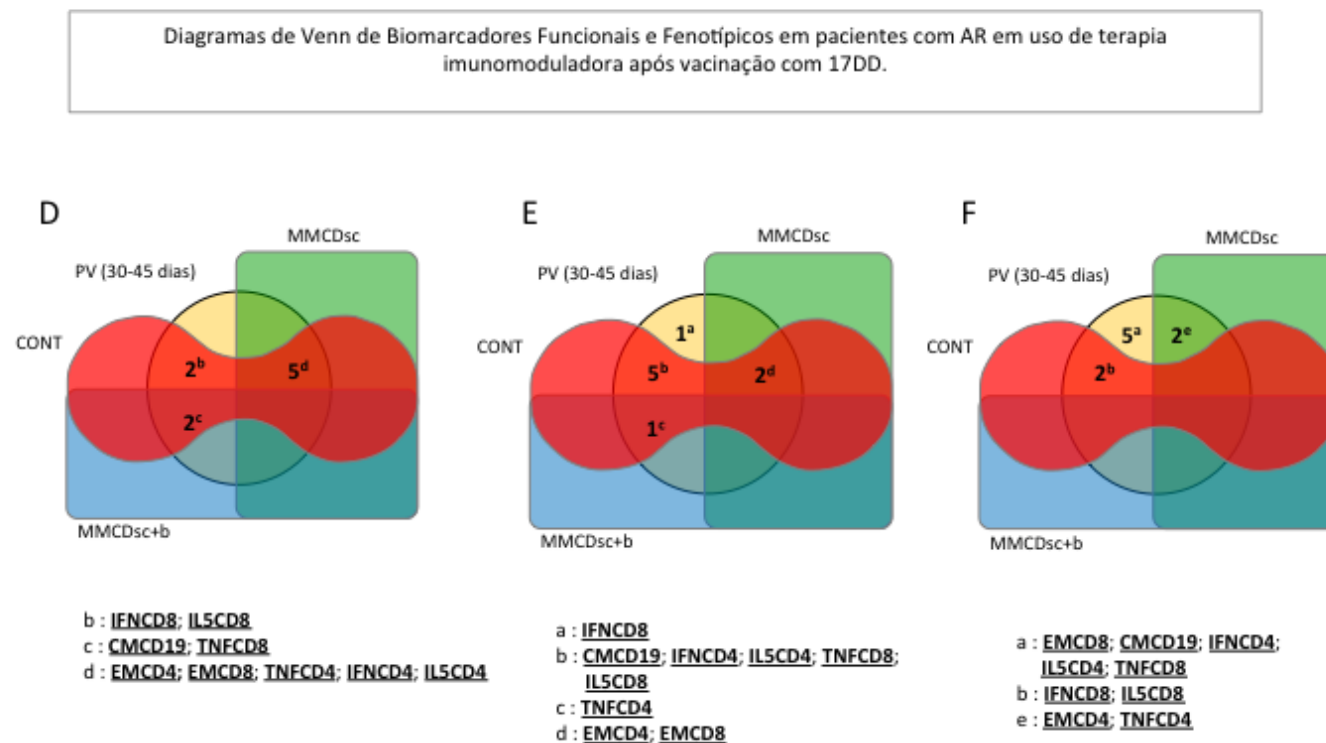


Figura 20. (D), (E) e (F). Diagramas de Venn foram construídos para visualizar os biomarcadores em comum com PV (30-45 dias) na análise comparativa. A letra "a" representa os biomarcadores observados exclusivamente em PV (30-45 dias). As letras "b", "c", "d" representam os biomarcadores presentes em PV (30-45 dias) \cap CONT; PV (30-45 dias) \cap CONT \cap MMCDsc e PV (30-45 dias) \cap CONT \cap MMCDsc, respectivamente. A letra "e" representa os biomarcadores compartilhados entre PV (30-45 dias) \cap MMCDsc.



Cartão postal do Rio de Janeiro mostrando um bonde tombado na Praça da República por manifestantes durante a Revolta da Vacina, novembro de 1904. Reproduzido de Fraiha Neto, H. Oswaldo Cruz e a Febre Amarela no Pará. 2ed – Ananideua: Instituto Evandro Chagas,2012.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Este é um trabalho inédito que tem por objetivo avaliar o impacto da terapia imunomoduladora sobre a memória vacinal induzida pela vacina 17DD em pacientes com AR em uso de imunomoduladores, que haviam sido previamente vacinados contra a febre amarela. Foi realizada uma análise da resposta humoral e celular sob uma perspectiva temporal (com análises de subgrupos nos períodos [1-5) anos, [5-10) anos e ≥ 10 anos pós-vacinação).

A análise da resposta humoral foi realizada com a dosagem de anticorpos neutralizantes pelo PRNT (sendo considerado soropositivo diluição sérica $>1:50$). Os resultados mostraram uma redução dos níveis de PRNT no decorrer do tempo em todos os grupos de estudo (CONT, MMCDsce MMCDsc+b) em comparação ao grupo PV(dias 30-45), o que já era esperado, pois há um declínio progressivo dos níveis de anticorpos particularmente após 10 anos de vacinação.[30, 58, 135]

No presente estudo, os grupos CONT e MMCDsc apresentam comportamento semelhante, com redução crítica do PRNT (abaixo de 80%) nos subgrupos ≥ 10 anos. Entretanto, o grupo MMCDsc+b apresentou redução precoce dos níveis de PRNT, perfazendo índice de soropositividade de 76% entre 5 e 10anos pós vacinação. Esse dado já indica que a associação de terapia biológica diminui a duração da resposta humoral à vacina 17DD.

Anticorpos neutralizantes são aqueles que promovem ação antiviral em presença de vírus selvagem. Seu papel protetor foi demonstrado em estudos experimentais dose-resposta, em que animais se mostraram protegidos após receber soro com dosagem de PRNT ≥ 40 [138]. Em virtude disso, são considerados os maiores marcadores de proteção ao VFA. [32, 139, 140]

A resposta humoral surge na primeira semana com anticorpos IgM, chegam ao pico na segunda semana e declinam ao longo de vários meses. Os anticorpos neutralizantes, principal proteção contra a reinfeção, aparecem ao fim da primeira semana e duram décadas.[7] Contudo, os níveis de PRNT decrescem com o passar do tempo, aproximadamente 25-30% dos vacinados apresentam sororeversão após 10 anos de vacinação[30, 141-143], o que

segundo alguns autores estaria plenamente justificada a necessidade de booster a cada 10 anos[135, 144, 145].

Em relação à análise da imunidade celular os grupos MMCD_{sce} MMCD_{sc+b} apresentaram um perfil distinto do grupo controle, com presença de níveis aumentados de eEfCD4 e reduzidos de CMCD4, NCD19 e nCMCD19. Isso pode ter ocorrido por particularidades da doença de base ou por efeito das drogas sintéticas e biológicas. Nesse estudo não foi possível avaliar um grupo com artrite reumatoide sem uso de terapia imunomoduladora, o que permitiria observar isoladamente o efeito da AR nas células de memória. Atualmente preconiza-se o tratamento precoce da AR (early AR), a fim de aproveitar a janela terapêutica da doença, minimizando o risco de deformidades[113].

A etiologia da AR não é completamente compreendida mas sabe-se que a ativação de linfócitos TCD4⁺ aberrante é parte crucial na iniciação e perpetuação da AR.[146]Estudosem que se compararam indivíduos com AR sem uso de medicação específica com controles saudáveis, observou-se maior frequência de células de memória efetoras terminalmente diferenciadas, enquanto células de memória central estavam diminuídas em relação ao controle.[146, 147]Todavia, a população de células de memória efetora tendem a cair com a resposta ao tratamento. [147] Os dados encontrados no presente estudo vão de encontro a estes resultados. No processo de diferenciação das células de memória, ocorre uma redução da expressão de CCR7 nas células de memória efetora. O CCR7 é um marcador que permite a localização da célula em órgãos linfoides secundários, ou seja, a perda do CCR7 caracteriza o fenótipo efetor, que está presente em tecidos inflamados.[148]

Entretanto o resultado mais interessante do presente estudo foi a redução dos níveis EMCD4, EMCD8 e CMCD8 observado no grupo MMCD_{sc+b} precocemente, entre 1-5 anos pós-vacinação. Essa redução também foi observada nos grupos CONT e MMCD_{sc}, porém após 10 anos de vacinação, o que permite inferir que a adição de terapia biológica interfere na memória vacinal celular induzida pela vacina 17DD.

Diversos estudos já relataram em detalhes o desenvolvimento da resposta imune celular induzida pela vacinação antiamarílica, em que ocorrem mudanças fenotípicas e funcionais para o estabelecimento de uma memória efetora eficaz. [49, 54, 55, 57, 72, 149] Tanto as linhagens de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ respondem rapidamente e de uma maneira intensa à vacinação, com expansão clonal, proliferação e diferenciação. [139]Linfócitos CD8⁺

agem reconhecendo e eliminando células infectadas pelo vírus, ao passo que linfócitos CD4⁺ orquestram a resposta imune celular permitindo a ativação de linfócitos B. Após o pico inicial de células TCD8⁺, há a transformação do fenótipo efetor em células de memória de longa duração com fenótipo polifuncional. [54]

Em relação à análise do perfil de citocinas, observa-se neste estudo, um perfil distinto dos grupos de AR, com níveis reduzidos de IL-5CD8 e IL-10CD19 quando comparado ao grupo controle. De forma semelhante à análise dos marcadores fenotípicos, também se observa uma redução de TNFCD4, que cai no decorrer do tempo pós-vacinação, sendo mais evidente no grupo em terapia biológica. TNFCD19, por sua vez, apresenta níveis reduzidos em ambos os grupos de AR, contudo, o que mais atrai a atenção é a queda precoce de IFNCD4, IFNCD8 e IL-5CD4 no grupo MMCDsc+b, que ocorre entre 1-5 anos pós-vacinação. No grupo apenas em uso de MMCDsintéticos, essas citocinas apresentam queda entre 5-10pós-vacinação. Esses dados corroboram a tese que a combinação de terapia sintética e biológica nos indivíduos com AR compromete significativamente a duração da memória vacinal.

A produção de citocinas ocorre de forma precoce e robusta nos 5º ao 7º dia pós-vacinação com a vacina 17DD. Concomitante com o pico de viremia, há o pico das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ □ TNF α e IL-2. [35] As citocinas regulatórias por sua vez, aumentam gradativamente com pico no dia 30 (IL-4 e IL-5), à exceção da IL-10, que tem aumento precoce no dia 3, um decréscimo no dia 5 e volta a subir entre os dias 6 e 7.[35]

IFN- γ é uma das moléculas de maior relevância na resposta Th1 e ativa macrófagos, NK e células TCD8⁺. Além disso é de suma importância no clearance viral, o que poderia prevenir a doença viscerotrópica[45]. Promove, ainda, a diferenciação das células B, levando à troca do isotipo de algumas subclasses de IgG. [45]

O TNF possui proeminente participação no estabelecimento da memória vacinal contra o vírus amarelo, sendo produzido principalmente por neutrófilos, monócitos e linfócitos TCD4⁺. [133] Sabe-se que indivíduos que não soroconvertem apresentam déficit de produção de citocinas pró-inflamatórias.[73]

Por outro lado, a produção de IL-5 pelas células T, com picos no d15 e d30 pós-vacinação pode representar um importante mecanismo de ativação de linfócitos B, com estímulo à produção de anticorpos e troca de isotipo.[133, 150] Em estudos com ratos, foram

encontrados receptores de IL-5 em linfócitos B, além de basófilos e neutrófilos em humanos. [150]

Costa-Pereira et al estudaram uma série de biomarcadores imunológicos a fim de identificar aqueles que estariam relacionados à proteção contra o vírus da febre amarela. Para isso, analisaram o status dos linfócitos de memória B e T em indivíduos primovacinaados com 17DD, além de também analisar o perfil de citocinas (IL5/ TNF/IFN/ IL-10). Com esse objetivo, coletaram o sangue de indivíduos primovacinaados 30-45 dias pós-vacinação [PV (30-45)], indivíduos não vacinados [NV (dia 0)], indivíduos vacinados há 1-9 anos [PV (1-9 anos)] e aqueles vacinados há 10-11 anos [PV (10-11 anos)]. Foram detectados uma relação de biomarcadores (eEfCD4; EMCD4; CMCD19; EMCD8; IFNCD4; TNFCD4; IFNCD8; TNFCD8; IL-5CD19; IL-5CD4) presentes em PV (30-45) e ausentes em NV (dia 0). A maioria desses marcadores também foram encontrados em PV (1-9 anos), mas estavam ausentes em PV (10-11 anos), o que sugere uma perda da resposta vacinal com o passar do tempo. O tratamento de dados de alta dimensionalidade, a partir de algoritmos abrangentes de biologia de sistemas definiram EMCD8 e IL-5CD4 como os dois melhores preditores fenotípicos e funcionais de memória. Esses biomarcadores associados ao PRNT foram considerados uma ferramenta útil para monitorar as respostas da vacina anti-amarela e a persistência da memória em populações distintas. [136] Os resultados do trabalho de Costa-Pereira *et al* mostram que a resposta imunológica induzida pela vacina 17DD persiste por cerca de 1-9 anos e diminui consideravelmente após 10 anos, independentemente da idade do indivíduo. [136]

No estudo atual tanto EMCD8 quanto IL-5CD4 apresentaram níveis reduzidos no grupo MMCDsc+b (1-5 anos), sugerindo uma perda precoce dos principais biomarcadores de memória vacinal contra a febre amarela.

Baseado nos resultados discutidos acima, conclui-se que pacientes com AR em uso de terapia associada sintética e biológica possuem menor duração da imunidade induzida pela vacina 17DD. Esses resultados podem estar relacionados à terapia combinada sintética e biológica, o que promove maior grau de imunossupressão, contudo, pelo desenho do estudo, não se conseguiu detectar o impacto da própria doença autoimune e também do grau de imunossupressão acumulada. Este grupo de indivíduos, em geral, possui uma doença mais agressiva, tendo feito uso de mais esquemas de tratamento e possui maior tempo de doença.

Em revisão de literatura, observa-se algo semelhante com outras vacinas. Em uma revisão sistemática em que se avaliou a eficácia das vacinas em vigência de terapia imunossupressora, o uso de anti-TNF reduziu a resposta humoral à vacina contra hepatite B, enquanto o metotrexato foi associado à redução da imunogenicidade das vacinas pneumocócicas.[151-153] O rituximabe, por sua vez, foi o fármaco mais associado à redução de proteção vacinal, principalmente em relação às vacinas influenza e pneumocócica[154, 155], com prejuízo de ambas as respostas humoral e celular.[156]

Gabay *et al* avaliou a resposta à vacina influenza em indivíduos com variadas doenças reumáticas (AR, espondiloartrites e outras doenças reumáticas inflamatórias) e observou que não havia influência da natureza da doença reumática subjacente e sim de alguns MMCDespecíficos como metotrexato, leflunomida e rituximabe. [155]Esse resultado foi corroborado em trabalho recente em que se avaliou a resposta humoral à vacina pneumocócica 13-valente em pacientes com AR e síndrome de Sjogren com e sem tratamento. A proporção de indivíduos que soroconverteram foi menor no grupo em uso de MMCD, mas não no grupo sem tratamento, quando comparado ao grupo controle.[157]

É importante notar que essas vacinas estudadas são recombinantes ou produzidas com organismos mortos, ao passo que a VFA é uma vacina com vírus vivo. As vacinas de vírus vivos têm maior potencial imunogênico, com maior produção de anticorpos e com respostas mais duradouras. [153] Contudo, conforme visto nos resultados do presente estudo, mesmo em vacinas de vírus vivo há potencial impacto da terapia associada biológica e sintética. Provavelmente, pela VFA ser vacina de vírus vivo, não foi observado impacto relevante no grupo em uso apenas de MMCDsintéticos, em que o fármaco mais usado foi o MTX, seguido da associação MTX +LEF.

Em síntese, os resultados deste estudo evidenciam que os indivíduos com AR tratados com terapia imunomoduladora sintética e biológica apresentam uma duração menor da imunidade promovida pela vacina 17DD. Isto significa dizer que esses pacientes apresentam um risco maior de desenvolver febre amarela, principalmente aqueles residentes ou viajantes para áreas endêmicas. Em um cenário em que há infestação do mosquito vetor em grande parte do território brasileiro, em que existe um risco de reurbanização da febre amarela e com surtos frequentes a cada ano, esses indivíduos estão vulneráveis, já que a vacina é o meio mais eficaz de prevenção.

Diante do exposto, sugere-se uma dose de reforço planejada da vacina antiamebílica para esses indivíduos, especialmente os residentes ou viajantes para áreas endêmicas. As Sociedades Brasileiras de Reumatologia, Medicina Tropical e Imunizações elaboraram uma nota técnica em que recomenda a classificação do indivíduo em graus de imunossupressão em baixo e alto grau. [158] Baixo grau seria aqueles em uso de metotrexato ≤ 20 mg/semana ou leflunomida 20mg/dia. Alto grau seria uso de corticoides ≥ 20 mg/dia ≥ 14 dias, pulsoterapia com metilprednisolona, imunomoduladores biológicos, inibidores de JAK, micofenolato de mofetil, ciclosporina, ciclofosfamida, tacrolimus ou azatioprina. Aqueles em uso de hidroxiquina, sulfasalazina ou corticoide tópico, inalatório, peri-articular ou intra-articular não são considerados imunossuprimidos. Recomenda que, para aqueles com baixo ou nenhum grau de imunossupressão, avaliar individualmente a indicação da vacina, mediante situação de risco. Para aqueles com alto grau de imunossupressão, recomenda suspender as medicações por um período mínimo antes de aplicar a VFA, considerando situações de risco e retornar o tratamento após intervalo mínimo de 4 semanas, conforme tabela abaixo.[158]. Lopez *et al* afirma, em sua revisão sistemática sobre vacinação em imunossuprimidos, que em caso de alta imunossupressão, a VFA pode ser considerada se houver um risco real de infecção. [159]

Tabela 3. MMCD sintéticos e biológicos e intervalo mínimo de suspensão para realizar vacinação com vacinas de vírus vivo.

| | Medicamentos | Intervalo entre suspensão e vacinação |
|--------------------|---|---------------------------------------|
| MMCD _{sc} | Prednisona > 20mg/dia ou pulso de metilprednisolona | Pelo menos 1 mês. |
| | SSZ, HCQ, MTX ≤ 20mg/semana Leflunomida 20mg/dia | Considerar vacinação sem intervalo |
| | MTX >20mg/dia | Pelo menos 1 mês. |
| | Ciclofosfamida, ciclosporina, micofenolato, tacrolimus, azatioprina | Pelo menos 3 meses. |
| | MMCD _{sae} | Tofacitinibe |
| MMCD _b | Anti citocinas e inibidores de co-estimulação | 4-5 meias-vidas |
| | Depletoras de linfócito B | 6-12 meses |

MMCD= medicamentos modificadores da atividade de doença; sc= sintéticos convencionais; sae= sintético alvo específico; b= biológicos; SSZ=sulfasalazina; HCQ= hidroxicloroquina; MTX= metotrexato. Fonte:Nota Técnica SBR/SBIm/SBI/SBMT: Vacina febre amarela em pacientes reumáticos - 31/01/2018. 2018.

Essa estratégia de booster planejado poderia aumentar a duração da memória vacinal antiamarílica de uma maneira segura, naqueles pacientes em risco de contrair a febre amarela e que se pudesse suspender temporariamente o imunossupressor a fim de realizar a vacinação. Contudo, deve-se avaliar os riscos e benefícios de tal estratégia caso a caso, com a confecção de estudos específicos em indivíduos imunossuprimidos.

8. LIMITAÇÕES DO TRABALHO

Os pontos fortes da pesquisa são a análise tanto da imunidade humoral quanto da imunidade celular, com estudo de biomarcadores fenotípicos e funcionais, a fim de avaliar a duração da memória vacinal à 17DD em indivíduos com AR em uso de terapia imunomoduladora, previamente vacinados. Foi uma pesquisa consistente, com amostra considerável em cada grupo.

Entretanto, o fato do estudo ser transversal é uma limitação, que não possibilita a análise temporal da memória vacinal em cada indivíduo. Além disso, a amostra de indivíduos com AR foi selecionada por conveniência, já que devido às implicações éticas de vacinar pacientes imunossuprimidos com vacinas vivas, seria difícil conseguir uma amostra de tamanho razoável selecionada de forma aleatória. É importante ressaltar ainda, que os indivíduos do grupo de estudo, em sua grande parte, haviam usado diversos esquemas terapêuticos, impossibilitando a análise do impacto de cada classe de MMCD isoladamente.

Além disso, as amostras analisadas da população estudada, muito provavelmente, tratam-se de revacinação contra a FA, haja vista que o Distrito Federal é área endêmica de febre amarela e a vacina consta no calendário vacinal. Esses dados foram comparados ao grupo submetido à primovacinação. Contudo, mesmo se tratando de uma população revacinada, os resultados são bastante robustos quanto à depleção precoce da memória vacinal no grupo em uso de terapia biológica, o que ratifica a vulnerabilidade dos pacientes com AR.



Primeira página do jornal “A Provincia do Pará”, de 11 de novembro de 1910, em que Oswaldo Cruz escreve uma mensagem à população do Pará, em que pede ajuda do povo para o combate à febre amarela. Reproduzido de Fraiha Neto, H. Oswaldo Cruz e a Febre Amarela no Pará. 2ed – Ananideua: Instituto Evandro Chagas,2012.

CONCLUSÃO

9.CONCLUSÃO

Conclui-se que, a partir dos resultados expostos e dos objetivos propostos, grupos específicos de imunomoduladores (biológicos, sintéticos ou uma combinação destes) utilizados no tratamento clínico de indivíduos com artrite reumatoide exercem impactos diferenciados na duração da memória vacinal desses indivíduos, quando previamente imunizados com a vacina antiamarflica 17DD.

O tratamento da AR com MMCD sintéticos não afeta a duração da memória vacinal induzida pela vacina 17DD, haja vista que não houve diferenças quando comparado ao grupo controle. Ambos apresentaram declínio na soropositividade mensurada pelo PRNT dez anos após a vacinação.

Entretanto, o tratamento combinado de drogas sintéticas e biológicas, ao conferir maior poder imunossupressor, leva a uma depleção precoce dos principais biomarcadores induzidos pela vacina, com queda nos níveis de anticorpos neutralizantes entre 5-10 anos pós-vacinação. Além disso, houve impacto também na imunidade celular, com níveis reduzidos de células de memória efetora TCD8⁺ no período de 1-5 anos pós-vacinação.

Em relação aos objetivos específicos:

1. Estimar e comparar a proporção de soropositividade e a média de reatividade dos títulos séricos de anticorpos neutralizantes contra a febre amarela em indivíduos com AR, em uso de terapias imunomoduladoras, previamente imunizados com 17DD.

- Os indivíduos em uso de terapia combinada sintética e biológica apresentaram redução dos níveis de anticorpos neutralizantes 5-10 anos pós-vacinação. O grupo em uso de MMCDsc apresentou perfil de anticorpos semelhante ao grupo controle.

2. Avaliar o perfil fenotípico /funcional de células T, antígeno-específicas para o VFA, de indivíduos com diagnóstico de artrite reumatoide, previamente imunizados com a vacina antiamarflica 17DD, estratificados conforme o grupo de imunomoduladores em uso (biológicos, sintéticos ou uma combinação destes) e segregados de acordo com o tempo pós-vacinação.

- O grupo MMCDsc+b, em particular, apresenta uma redução precoce dos níveis de EMCD4, CMCD8 e EMCD8, observado entre 1-5 anos pós-vacinação, quando comparado ao grupo CONT e MMCDsc. Em relação aos biomarcadores funcionais, foram encontrados menores níveis de IFNCD4, IFNCD8, TNFCD4 e IL-5CD4 no grupo em terapia biológica comparado aos grupos CONT e MMCDsc.

3. Avaliar o perfil fenotípico /funcional de células B, antígeno-específicas para o VFA de indivíduos com diagnóstico de artrite reumatoide, previamente imunizados com a vacina antiamarílica 17DD, estratificados conforme o grupo de imunomoduladores em uso (biológicos, sintéticos ou uma combinação destes) e segregados de acordo com o tempo pós-vacinação.

- Os grupos de AR (MMCDsc e MMCDsc+b) apresentaram níveis reduzidos de NCD19, nCMCD19 e IL-10CD19 quando comparado ao grupo controle.

11. PRODUÇÕES RELACIONADAS A TESE

Esta tese gerou duas publicações, apresentação em congresso nacional como tema livre e duas palestras sobre o tema abaixo listadas:

11.1 Publicações

- Ferreira CC, Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhães V, Costa-Pereira C, Albuquerque CP, Muniz LF, Souza TY, Oliveira ACV, Martins-Filho OA, Mota LCM. The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences. *Expert Review of Vaccines* 2018; 7(1): 79-90 DOI:10.1080/14760584.2018.1406800

Fator de impacto 2018: 4.531 – a revista sobre vacinas com o maior fator de impacto.

QUALIS/ CAPES (2013-2016): Área de avaliação: MEDICINA I: A2.

- Ferreira CC, Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhães V, Coelho-dos Reis JG, Antonelli LRV, Torres K, Freire LC, Costa-Rocha IA, Oliveira ACV, Maia MLS, Lima SMB, Domingues CM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Mota LMH. Impact of synthetic and biological immunomodulatory therapy on the duration of 17DD yellow fever vaccine-induced immunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy* 2019; 21 (1): 75 doi: 10.1186/s13075-019-1854-6.

Fator de impacto 2018: 4.148

QUALIS/ CAPES (2013-2016): Área de avaliação: MEDICINA I: A1.

11.2 Apresentação em Congresso

XXXIV Congresso Brasileiro de Reumatologia, 13 a 16 de setembro de 2017, Florianópolis, SC. Apresentação de tema livre: Imunidade vacinal antiamarílica em pacientes com artrite reumatoide em uso de terapias imunomoduladoras.

11.3 Palestras

- IX Jornada Mineira e XXI Jornada Centro-Oeste de Reumatologia, 3-5 de agosto de

2017, Tiradentes, MG. Febre amarela e o contexto atual.

- X Encontro Goiás-Distrito Federal, 23 a 24 de novembro de 2018, Pirenópolis, GO.
Revacinação contra febre amarela em pacientes imunossuprimidos?

REFERÊNCIAS

1. Ferreira CC, Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhães V, Costa-Pereira C, Albuquerque CP, Muniz LF et al. The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences. *Exp Rev Vaccines* 2017; 17(1):79-90.
2. Yellow fever: a global reckoning [editorial]. *Lancet* 2016, 387(10026):1348
3. Chan M. Yellow fever: the resurgence of a forgotten disease. *Lancet* 2016; 387(10034):2165-2166.
4. Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2015; 64:160-173.
5. Barrett AD, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annual review of entomology* 2007; 52:209-229.
6. Vasconcelos PF: Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2003, 36(2):275-293.
7. Monath TP. Yellow fever: an update. *The Lancet Infectious diseases* 2001; 1(1):11-20.
8. Vasconcelos PF, Costa ZG, Travassos Da Rosa ES, Luna E, Rodrigues SG, Barros VL, et al. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. *Journal of medical virology* 2001; 65(3):598-604.
9. Centers of Disease Control. Yellow fever. [acesso em 29 jun 2017] Disponível em: [<https://http://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/index.html>]
10. Tomori O. Yellow fever: the recurring plague. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 2004; 41(4):391-427.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Reemergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil, 2014/2015: situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no período sazonal. In. Edited by Sistema de Vigilância em Saúde, vol. 46. *Boletim Epidemiológico Ministerio da Saúde (BR)*; 2015: 1-10.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Monitoramento do período sazonal da febre amarela Brasil- 2018/2019. 2019. Disponível em [https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/17/informe-FA-n.2_12dez18.pdf]
13. Epidemiological update. Epidemiological update: Yellow fever outbreak in Brazil. [acesso em 30 jun 2017] Disponível em: [<http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/News - Epidemiological update Yellow fever outbreak..pdf>]
14. Ortiz-Martinez Y, Patino-Barbosa AM, Rodriguez-Morales AJ. Yellow fever in the Americas: the growing concern about new epidemics. *F1000Research* 2017; 6:398.
15. Goldani LZ. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 2017; 21(2):123-124

16. Ramos D, Alves R, Domingues C, Romano A, Castro A, Barros C et al. Febre Amarela. In. *Bol Epidemiol*; 2019. Disponível em [<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/25/boletim-especial-21ago19-web.pdf>]
17. Monath TP, Woodall JP, Gubler DJ, Yuill TM, Mackenzie JS, Martins RM, et al. Yellow fever vaccine supply: a possible solution. *Lancet* 2016; 387(10028):1599-1600.
18. Barrett AD. Yellow Fever in Angola and Beyond--The Problem of Vaccine Supply and Demand. *The New England journal of medicine* 2016. 375(4):301-303.
19. World Health Organization. Stepping up local efforts to stop global spread of yellow fever. *Bulletin of the World Health Organization* 2018, 96(6):374-375.
20. Calisher CH, Woodall JP. Yellow Fever--More a Policy and Planning Problem than a Biological One. *Emerging infectious diseases* 2016; 22(10):1859-1860.
21. Quaresma JA, 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. *Rev Med Virol* 2013. 23:305-318.
22. Barnett ED. Yellow Fever: epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:850-856.
23. Gibney KB, Edupuganti S, Panella AJ, Kosoy OI, Delorey MJ, Lanciotti RS, et al. Detection of anti-yellow fever virus immunoglobulin m antibodies at 3-4 years following yellow fever vaccination. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2012; 87(6):1112-1115.
24. Vieira V, Pacheco L, Demetrio L, Balbi E, Bellinha T, Toledo R et al. Liver Transplantation for Acute Liver Failure due to Yellow Fever: A Case Report. *Transplantation proceedings* 2019, 51(5):1625-1628.
25. Pulendran B, Oh JZ, Nakaya HI, Ravindran R, Kazmin DA. Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. *Immunological reviews* 2013; 255(1):243-255.
26. Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. *Jama* 2008; 300(8):960-962.
27. Norrby E. Yellow fever and Max Theiler: the only Nobel Prize for a virus vaccine. *The Journal of experimental medicine* 2007; 204(12):2779-2784.
28. Theiler M, Smith HH: The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *The Journal of experimental medicine* 1937; 65(6):787-800.
29. Bres PL. A century of progress in combating yellow fever. *Bulletin of the World Health Organization* 1986; 64(6):775-786.
30. Melo AB, Silva MP, Magalhaes MC, Gil LHG, Carvalho EMF, Braga-Neto UM et al.: Description of a prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2011; 85(4):739-747.
31. Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: a reemerging threat. *Clinics in laboratory medicine* 2010; 30(1):237-260.
32. Liang H, Lee M, Jin X. Guiding dengue vaccine development using knowledge gained from the success of the yellow fever vaccine. *Cellular & molecular immunology* 2016; 13(1):36-46.

33. Camacho LAB, Aguiar SG, Freire MS, Leal ML, Nascimento JP, Iguchi T, et al. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. *Revista de saude publica* 2005; 39(3):413-420.
34. Fernandes GC. Imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre amarela: implicações para o Programa Nacional de Imunizações. Tese [Doutorado]. Fundação Oswaldo Cruz; 2010.
35. Campi-Azevedo AC, Estevam PA, Coelho-Dos-Reis JG, Peruhype-Magalhaes V, Villela-Rezende G, Quaresma PF et al. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. *BMC infectious diseases* 2014; 14:391. doi: 10.1186/1471-2334-14-391.
36. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação, 3.ed.; 2014.
37. Jentes ES, Pomeroy G, Gershman MD, Hill DR, Lemarchand J, Lewis RF, et al. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *The Lancet Infectious diseases* 2011; 11(8):622-632.
38. Martins RM, Leal MLF, Homma A. Serious adverse events associated with yellow fever vaccine. *Human vaccines & immunotherapeutics* 2015; 11(9):2183-2187.
39. Pulendran B, Miller J, Querec TD, Akondy R, Moseley N, Laur O, et al. Case of yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes. *The Journal of infectious diseases* 2008; 198(4):500-507.
40. Silva ML, Espirito-Santo LR, Martins MA, Silveira-Lemos D, Peruhype-Magalhaes V, Caminha RC, et al. Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2010; 17(1):118-126.
41. Martins MA, Silva ML, Eloi-Santos SM, Ribeiro JG, Peruhype-Magalhaes V, Marciano AP, et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine* 2008; 26(9):1173-1184.
42. Neves PC, Matos DC, Marcovistz R, Galler R. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine* 2009; 27(41):5543-5549.
43. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nature immunology* 2009; 10(1):116-125.
44. Kabelitz D, Wesch D. Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors. *Critical reviews in immunology* 2003; 23(5-6):339-370.
45. Neves PC, Rudersdorf RA, Galler R, Bonaldo MC, Santana MG, Mudd PA, et al. CD8+ gamma-delta TCR+ and CD4+ T cells produce IFN-gamma at 5-7 days after yellow fever vaccination in Indian rhesus macaques, before the induction of classical antigen-specific T cell responses. *Vaccine* 2010; 28(51):8183-8188.
46. Neves PC, Santos JR, Tubarao LN, Bonaldo MC, Galler R. Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptive immune responses. *PloS one* 2013; 8(12):e81953.

47. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *The Journal of experimental medicine* 2008; 205(13):3119-3131.
48. Akondy RS, Johnson PL, Nakaya HI, Edupuganti S, Mulligan MJ, Lawson B, et al. Initial viral load determines the magnitude of the human CD8 T cell response to yellow fever vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; 112(10):3050-3055.
49. Martins MA, Silva ML, Marciano AP, Peruhype-Magalhaes V, Eloi-Santos SM, Ribeiro JG, et al. Activation/modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: is this the key to prevent severe adverse reactions following immunization? *Clinical and experimental immunology* 2007; 148(1):90-100.
50. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of experimental medicine* 1991; 174(4):915-924.
51. Santos AP, Bertho AL, Dias DC, Santos JR, Marcovistz R. Lymphocyte subset analyses in healthy adults vaccinated with yellow fever 17DD virus. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005; 100(3):331-337.
52. Ahmed R, Akondy RS. Insights into human CD8(+) T-cell memory using the yellow fever and smallpox vaccines. *Immunology and cell biology* 2011; 89(3):340-345.
53. Bannard O, Kraman M, Fearon D. Pathways of memory CD8+ T-cell development. *European journal of immunology* 2009; 39(8):2083-2087.
54. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol* 2009; 183(12):7919-7930.
55. Blom K, Braun M, Ivarsson MA, Gonzalez VD, Falconer K, Moll M, et al. Temporal dynamics of the primary human T cell response to yellow fever virus 17D as it matures from an effector- to a memory-type response. *J Immunol* 2013; 190(5):2150-2158.
56. Wieten RW, Jonker EF, van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Ten Berge IJ, de Visser AW, et al. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination. *PloS one* 2016; 11(3):e0149871.
57. Campi-Azevedo AC, Costa-Pereira C, Antonelli LR, Fonseca CT, Teixeira-Carvalho A, Villela-Rezende G, et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Human vaccines & immunotherapeutics* 2016; 12(2):491-502.
58. Reinhardt B, Jaspert R, Niedrig M, Kostner C, L'Age-Stehr J. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *Journal of medical virology* 1998; 56(2):159-167.

59. Kohler S, Bethke N, Bothe M, Sommerick S, Frentsch M, Romagnani C, et al. The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination. *European journal of immunology* 2012; 42(9):2363-2373.
60. James EA, LaFond RE, Gates TJ, Mai DT, Malhotra U, Kwok WW. Yellow fever vaccination elicits broad functional CD4+ T cell responses that recognize structural and nonstructural proteins. *Journal of virology* 2013; 87(23):12794-12804.
61. Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bulletin of the World Health Organization* 1981; 59(6):895-900.
62. Gotuzzo E, Yactayo S, Cordova E. Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2013; 89(3):434-444.
63. Monath TP, Nichols R, Archambault WT, Moore L, Marchesani R, Tian J, et al. Comparative safety and immunogenicity of two yellow fever 17D vaccines (ARILVAX and YF-VAX) in a phase III multicenter, double-blind clinical trial. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2002; 66(5):533-541.
64. Pierson TC, Fremont DH, Kuhn RJ, Diamond MS. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. *Cell host & microbe* 2008; 4(3):229-238.
65. Watson AM, Lam LK, Klimstra WB, Ryman KD. The 17D-204 Vaccine Strain-Induced Protection against Virulent Yellow Fever Virus Is Mediated by Humoral Immunity and CD4+ but not CD8+ T Cells. *PLoS pathogens* 2016, 12(7):e1005786 doi:10.1371/journal.ppat.1005786
66. Camacho LA, Freire MS, Leal ML, Aguiar SG, Nascimento JP, Iguchi T, et al. Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial. *Revista de saude publica* 2004; 38(5):671-678.
67. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Experimental cell research* 2011; 317(5):620-631.
68. Scherer CA, Magness CL, Steiger KV, Poitinger ND, Caputo CM, Miner DG, et al. Distinct gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients infected with vaccinia virus, yellow fever 17D virus, or upper respiratory infections. *Vaccine* 2007; 25(35):6458-6473.
69. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Normas de Vacinação. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2001.
70. Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. Randomized, double-blind, multicenter study of the immunogenicity and reactogenicity of 17DD and WHO 17D-213/77 yellow fever vaccines in children: Implications for the Brazilian National Immunization Program. *Vaccine* 2007; 25:3118-3123.
71. Collaborative Group for Studies with Yellow Fever Vaccine. A randomised double-blind clinical trial of two yellow fever vaccines prepared with substrains 17DD and 17D-213/77 in children nine-23 months old. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2015; 110(6):771-780.
72. Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Avelar RS, Lemos DS, et al. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *The Journal of infectious diseases* 2011; 204(6):873-883.

73. Campi-Azevedo AC, Araujo-Porto LP, Luiza-Silva M, Batista MA, Martins MA, Sathler-Avelar R, et al. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. *PloS one* 2012; 7(12):e49828.
74. Salvioli S, Monti D, Lanzarini C, Conte M, Pirazzini C, Bacalini MG, et al. Immune system, cell senescence, aging and longevity--inflamm-aging reappraised. *Current pharmaceutical design* 2013; 19(9):1675-1679.
75. Roukens AH, Soonawala D, Joosten SA, de Visser AW, Jiang X, Dirksen K, et al. Elderly subjects have a delayed antibody response and prolonged viraemia following yellow fever vaccination: a prospective controlled cohort study. *PloS one* 2011; 6(12):e27753.
76. Miyaji KT, Luiz AM, Lara AN, Chaves TSS, Piorelli RO, Lopes MH, et al. Active assessment of adverse events following yellow fever vaccination of persons aged 60 years and more. *Human vaccines & immunotherapeutics* 2013; 9(2):277-282.
77. 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2012; 86(2):359-372.
78. Monath TP, Cetron MS. Prevention of yellow fever in persons traveling to the tropics. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2002; 34(10):1369-1378.
79. Duchet-Niedziolka P, Launay O, Coutsinos Z, Ajana F, Arlet P, Barrou B, et al. Vaccination in adults with auto-immune disease and/or drug related immune deficiency: results of the GEVACCIM Delphi survey. *Vaccine* 2009; 27(10):1523-1529.
80. van Assen S, Agmon-Levin N, Elkayam O, Cervera R, Doran MF, Dougados M, et al. EULAR recommendations for vaccination in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases* 2011; 70(3):414-422.
81. Brenol CV, Mota LM, Cruz BA, Pileggi GS, Pereira IA, Rezende LS, et al. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus on vaccination of patients with rheumatoid arthritis. *Revista brasileira de reumatologia* 2013; 53(1):4-23.
82. Veit O, Niedrig M, Chapuis-Taillard C, Cavassini M, Mossdorf E, Schmid P, et al. Immunogenicity and safety of yellow fever vaccination for 102 HIV-infected patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009; 48(5):659-666.
83. Ho YL, Enohata T, Lopes MH, Santos SS. Vaccination in Brazilian HIV-infected adults: a cross-sectional study. *AIDS patient care and STDs* 2008; 22(1):65-70.
84. Tattevin P, Depatureaux AG, Chapplain JM, Dupont M, Souala F, Arvieux C, et al. Yellow fever vaccine is safe and effective in HIV infected patients. *AIDS* 2004; 18(5):823-825.
85. Pistone T, Verdiere CH, Receveur MC, Ezzedine K, Lafon ME, Malvy D. Immunogenicity and tolerability of yellow fever vaccination in 23 French HIV-infected patients. *Current HIV research* 2010; 8(6):461-466.
86. Pacanowski J, Lacombe K, Campa P, Dabrowska M, Poveda JD, Meynard JL, et al. Plasma HIV-RNA is the key determinant of long-term antibody persistence after

- Yellow fever immunization in a cohort of 364 HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; 59(4):360-367.
87. Azevedo LS, Lasmar EP, Contieri FL, Boin I, Percegon L, Saber LT, et al. Yellow fever vaccination in organ transplanted patients: is it safe? A multicenter study. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 2012; 14(3):237-241.
 88. Yax JA, Farnon EC, Cary Engleberg N. Successful immunization of an allogeneic bone marrow transplant recipient with live, attenuated yellow Fever vaccine. *Journal of travel medicine* 2009; 16(5):365-367.
 89. Avelino-Silva VI, Freire MS, Rocha V, Rodrigues CA, Novis YS, Sabino EC, et al. Persistence of Yellow Fever vaccine-induced antibodies after cord blood stem cell transplant. *Human vaccines & immunotherapeutics* 2016; 12(4):937-938.
 90. Avelino-Silva VI, Leal FE, Sabino EC, Nishiya AS, Freire MS, Blumm F, et al. Yellow fever vaccine viremia following ablative BM suppression in AML. *Bone marrow transplantation* 2013; 48(7):1008-1009.
 91. Mota LM, Oliveira AC, Lima RA, Santos-Neto LL, Tauil PL.[Vaccination against yellow fever among patients on immunosuppressors with diagnoses of rheumatic diseases]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42(1):23-27.
 92. Oliveira AC, Mota LM, Santos-Neto LL, Simoes M, Martins-Filho OA, Tauil PL.Seroconversion in patients with rheumatic diseases treated with immunomodulators or immunosuppressants, who were inadvertently revaccinated against yellow fever. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67(2):582-583..
 93. Scheinberg M, Guedes-Barbosa LS, Manguiera C, Rosseto EA, Mota L, Oliveira AC, et al. Yellow fever revaccination during infliximab therapy. *Arthritis care & research* 2010; 62(6):896-898.
 94. Nash ER, Brand M, Chalkias S. Yellow Fever Vaccination of a Primary Vaccinee During Adalimumab Therapy. *Journal of travel medicine* 2015; 22(4):279-281.
 95. Stuhec M. Yellow fever vaccine used in a psoriatic arthritis patient treated with methotrexate: a case report. *Acta Dermatovenerol APA* 2014; 23:63-64.
 96. Kerneis S, Launay O, Ancelle T, Iordache L, Naneix-Laroche V, Mechai F, et al: Safety and immunogenicity of yellow fever 17D vaccine in adults receiving systemic corticosteroid therapy: an observational cohort study. *Arthritis care & research* 2013; 65(9):1522-1528.
 97. Wieten RW, Goorhuis A, Jonker EF, de Bree GJ, de Visser AW, van Genderen PJ, et al. 17D yellow fever vaccine elicits comparable long-term immune responses in healthy individuals and immune-compromised patients. *The Journal of infection* 2016;72(6):713-722.
 98. Wieten RW, Jonker EF, Pieren DK, Hodiament CJ, van Thiel PP, van Gorp EC, et al. Comparison of the PRNT and an immune fluorescence assay in yellow fever vaccinees receiving immunosuppressive medication. *Vaccine* 2016; 34(10):1247-1251.
 99. Opata MM, Stephens R. Early Decision: Effector and Effector Memory T Cell Differentiation in Chronic Infection. *Current immunology reviews* 2013; 9(3):190-206.

100. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *European journal of immunology* 2013; 43(11):2797-2809.
101. Lauvau G, Boutet M, Williams TM, Chin SS, Chorro L. Memory CD8(+) T Cells: Innate-Like Sensors and Orchestrators of Protection. *Trends in immunology* 2016; 37(6):375-385.
102. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nature reviews Immunology* 2015; 15(3):149-159..
103. Rivas JJ, Brocardo G, Kokron C, Rizzo LV, Kalil J, Barros MT. Immunophenotypical characterization of memory B lymphocytes in IgA deficiency and common variable immunodeficiency *Rev Bras Alerg Imunopatol* 2010; 33(1):23-31.
104. Araki Y, Mimura T. The Mechanisms Underlying Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis from the Perspective of the Epigenetic Landscape. *Journal of immunology research* 2016; 2016:6290682.
105. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2016; 388(10055):2023-2038.
106. Bellucci E, Terenzi R, La Paglia GM, Gentileschi S, Tripoli A, Tani C, et al. One year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 2016; 34(5):793-801.
107. Ciconelli RM. Artrite Reumatóide – epidemiologia e etiopatogenia. *Rev Sinopse de Reumatol* 2001, 3(2):1-17.
108. Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. *Journal of autoimmunity* 2012; 39(3):222-228..
109. Coates LC, FitzGerald O, Helliwell PS, Paul C. Psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis: Is all inflammation the same? *Seminars in arthritis and rheumatism* 2016; 46(3):291-304.
110. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *Jama* 2018; 320(13):1360-1372.
111. Mota L, Kakehasi AM, Gomides APM, Duarte A, Cruz BA, Brenol CV, et al. 2017 recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. *Adv Rheumatol* 2018; 58(1):2.
112. Anderson JK, Zimmerman L, Caplan L, Michaud K. Measures of rheumatoid arthritis disease activity: Patient (PtGA) and Provider (PrGA) Global Assessment of Disease Activity, Disease Activity Score (DAS) and Disease Activity Score with 28-Joint Counts (DAS28), Simplified Disease Activity Index (SDAI), Clinical Disease Activity Index (CDAI), Patient Activity Score (PAS) and Patient Activity Score-II (PASII), Routine Assessment of Patient Index Data (RAPID), Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index (RADAI) and Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index-5 (RADAI-5), Chronic Arthritis Systemic Index (CASI), Patient-Based Disease Activity Score With ESR (PDAS1) and Patient-Based Disease Activity Score without ESR (PDAS2), and Mean Overall Index for Rheumatoid Arthritis (MOI-RA). *Arthritis care & research* 2011;63 Suppl 11:S14-36..
113. Combe B, Landewe R, Daien CI, Hua C, Aletaha D, Alvaro-Gracia JM, et al: 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2016; 76(6):948-959

114. Kremer JM, Lawrence DA, Hamilton R, McInnes IB: Long-term study of the impact of methotrexate on serum cytokines and lymphocyte subsets in patients with active rheumatoid arthritis: correlation with pharmacokinetic measures. *RMD open* 2016; 2(1):e000287..
115. Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nature reviews Rheumatology* 2016; 12(12):731-742.
116. Thomas S, Fisher KH, Snowden JA, Danson SJ, Brown S, Zeidler MP. Methotrexate Is a JAK/STAT Pathway Inhibitor. *PloS one* 2015;10(7) doi:10.1371/journal.pone.0130078.
117. Cribbs AP, Kennedy A, Penn H, Amjadi P, Green P, Read JE, et al. Methotrexate Restores Regulatory T Cell Function Through Demethylation of the FoxP3 Upstream Enhancer in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67(5):1182-1192.
118. Peres RS, Liew FY, Talbot J, Carregaro V, Oliveira RD, Almeida SL, et al. Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; 112(8):2509-2514.
119. O'Donnell EF, Saili KS, Koch DC, Kopparapu PR, Farrer D, Bisson WH, et al. The anti-inflammatory drug leflunomide is an agonist of the aryl hydrocarbon receptor. *PloS one* 2010; 5(10).
120. Zhu M, Xu Q, Li XL, He Q, Wang WF. Modulating effects of leflunomide on the balance of Th17/Treg cells in collageninduced arthritis DBA/1 mice. *Central-European journal of immunology* 2014; 39(2):152-158.
121. Silva JC, Mariz HA, Rocha LF, Jr., Oliveira PS, Dantas AT, Duarte AL, et al. Hydroxychloroquine decreases Th17-related cytokines in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Clinics (Sao Paulo)* 2013; 68(6):766-771.
122. van Loosdregt J, Spreafico R, Rossetti M, Prakken BJ, Lotz M, Albani S. Hydroxychloroquine preferentially induces apoptosis of CD45RO+ effector T cells by inhibiting autophagy: a possible mechanism for therapeutic modulation of T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; 131(5):1443-1446 e1441
123. Jinesh S. Pharmaceutical aspects of anti-inflammatory TNF-blocking drugs. *Inflammopharmacology* 2015; 23(2-3):71-77.
124. Pieper J, Herrath J, Raghavan S, Muhammad K, Vollenhoven R, Malmstrom V. CTLA4-Ig (abatacept) therapy modulates T cell effector functions in autoantibody-positive rheumatoid arthritis patients. *BMC immunology* 2013; 14:34.
125. Scarsi M, Paolini L, Ricotta D, Pedrini A, Piantoni S, Caimi L, et al. Abatacept reduces levels of switched memory B cells, autoantibodies, and immunoglobulins in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 2014; 41(4):666-672.
126. Miyabe C, Miyabe Y, Strle K, Kim ND, Stone JH, Luster AD, et al. An expanded population of pathogenic regulatory T cells in giant cell arteritis is abrogated by IL-6 blockade therapy. *Annals of the rheumatic diseases* 2017; 76(5):898-905.
127. Cohen MD, Keystone E. Rituximab for Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology and therapy* 2015; 2(2):99-111.

128. Hodge JA, Kawabata TT, Krishnaswami S, Clark JD, Telliez JB, Dowty ME, et al. The mechanism of action of tofacitinib - an oral Janus kinase inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 2016; 34(2):318-328..
129. Simoes M, Camacho LA, Yamamura AM, Miranda EH, Cajaraville AC, Freire MS. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 2012; 40(6):399-404..
130. Silva JRN. Avaliação da Interferência da vacinação contra febre amarela na vacinação contra rubéola. 2008 (Dissertação). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca: FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
131. Miyaji KT, Avelino-Silva VI, Simoes M, Freire MD, Medeiros CR, Braga PE, et al. Prevalence and titers of yellow fever virus neutralizing antibodies in previously vaccinated adults. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 2017; 59:e2http://dx.doi.org/10.1590/s1678-9946201759002
132. Gazzinelli G, Katz N, Rocha RS, Colley DG. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. *J Immunol* 1983; 130(6):2891-2895.
133. Silva ML, Martins MA, Espirito-Santo LR, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JG, et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine* 2011; 29(3):583-592.
134. Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva LA, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clinical and experimental immunology* 2006, 146(1):124-132..
135. Campi-Azevedo AC, Costa-Pereira C, Antonelli LR, Fonseca CT, Teixeira-Carvalho A, Villela-Rezende G, et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Human vaccines & immunotherapeutics* 2016; 12(2):491-502.
136. Costa-Pereira C, Campi-Azevedo AC, Coelho-dos-Reis JG, Peruhype-Magalhães V, Araújo MSS, Antonelli LRV et al. Multi-parameter approach to evaluate the timing of memory status after primary 17DD-YF vaccination. *PLoS neglected tropical diseases* 2018; 12(6) e0006462. doi: 10.1371/journal.pntd.0006462..
137. Lam F, Lalansingh CM, Babaran HE, Wang Z, Prokopec SD, Fox NS, et al. VennDiagramWeb: a web application for the generation of highly customizable Venn and Euler diagrams. *BMC bioinformatics* 2016; 17(1):401.
138. Julander JG, Trent DW, Monath TP. Immune correlates of protection against yellow fever determined by passive immunization and challenge in the hamster model. *Vaccine* 2011; 29(35):6008-6016
139. Watson AM, Klimstra WB. T Cell-Mediated Immunity towards Yellow Fever Virus and Useful Animal Models. *Viruses* 2017; 9(4) doi: 10.3390/v9040077

140. Mason RA, Tauraso NM, Spertzel RO, Ginn RK. Yellow fever vaccine: direct challenge of monkeys given graded doses of 17D vaccine. *Applied microbiology* 1973; 25(4):539-544.
141. Groot H, Riberiro RB. Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibodies to yellow fever 17 years after vaccination with 17D vaccine. *Bulletin of the World Health Organization* 1962; 27:699-707.
142. 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 & international health : TM & IH* 1999; 4(12):867-871.
143. Gómez SY, Ocazonez RE. Yellow fever virus 17D neutralizing antibodies in vaccinated Colombian people and unvaccinated ones having immunity against dengue. *Rev Salud Publica (Bogota)* 2008; 10:796-807.
144. Collaborative Group for Studies on Yellow Fever Vaccine. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. *Vaccine* 2014; 32(39):4977-4984.
145. Amanna IJ, Slifka MK. Questions regarding the safety and duration of immunity following live yellow fever vaccination. *Expert review of vaccines* 2016; 15(12):1519-1533.
146. Zhou H, Hu B, Zhaopeng Z, Liu J, Zhong Q, Fan Yet al. Elevated circulating T cell subsets and cytokines expression in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology* 2019; 38(7):1831-1839.
147. Fonseka CY, Rao DA, Teslovich NC, Korsunsky I, Hannes SK, Slowikowski K, et al: Mixed-effects association of single cells identifies an expanded effector CD4(+) T cell subset in rheumatoid arthritis. *Science translational medicine* 2018; 10(463) doi: 10.1126/scitranslmed.aag0305
148. Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, et al: CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 2001; 166(2):877-884.
149. Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, Glidewell JT, Albott S, Masopust D, et al: Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* 2008; 28(5):710-722.
150. Dougan M, Dranoff G, Dougan SK. GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation. *Immunity* 2019; 50(4):796-811.
151. Friedman MA, Winthrop KL. Vaccines and Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: Practical Implications for the Rheumatologist. *Rheumatic diseases clinics of North America* 2017; 43(1):1-13.
152. Rakoczi E, Szekanecz Z. Pneumococcal vaccination in autoimmune rheumatic diseases. *RMD open* 2017; 3(2):e000484 doi: 10.1136/rmdopen-2017-000484
153. McMahan ZH, Bingham CO, 3rd. Effects of biological and non-biological immunomodulatory therapies on the immunogenicity of vaccines in patients with rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* 2014; 16(6):506.
154. Friedman MWK. Vaccines and Disease-Modifying Antirheumatic Drugs - Practical Implications for the Rheumatologist. *Rheumatic diseases clinics of North America* 2017; 43(1):1-13.
155. Gabay C, Bel M, Combescure C, Ribic C, Meier S, Posfay-Barbe K, et al. Impact of synthetic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs on antibody responses

- to the AS03-adjuvanted pandemic influenza vaccine: a prospective, open-label, parallel-cohort, single-center study. *Arthritis and rheumatism* 2011; 63(6):1486-1496.
156. Meroni PL, Zavaglia D, Girmenia C. Vaccinations in adults with rheumatoid arthritis in an era of new disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Clinical and experimental rheumatology* 2018; 36 (2): 317-328
 157. Nived P, Saxne T, Geborek P, Mandl T, Skattum L, Kapetanovic MC. Antibody response to 13-valent pneumococcal conjugate vaccine is not impaired in patients with rheumatoid arthritis or primary Sjogren's syndrome without disease modifying treatment. *BMC rheumatology* 2018; 2:12doi: 10.1186/s41927-018-0019-6.
 158. Sociedade Brasileira de Reumatologia. Nota Técnica SBR/SBIm/SBI/SBMT: Vacina febre amarela em pacientes reumáticos - 31/01/2018. [Português] In. <https://sbim.org.br/images/files/nt-fa-reumato-sbr-sbim-sbi-sbmt-180131.pdf>; 2018.Acessado 02/07/2018.
 159. Lopez A, Mariette X, Bachelez H, Belot A, Bonnotte B, Hachulla E, et al: Vaccination recommendations for the adult immunosuppressed patient: A systematic review and comprehensive field synopsis. *Journal of autoimmunity* 2017;80:10-27.

ANEXO 1- Carta de Aprovação do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMUNIDADE VACINAL ANTIAMARÍLICA EM PACIENTES EM USO DE TERAPIAS IMUNOMODULADORAS.

Pesquisador: Martins-Filho OA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11312012.6.0000.5091

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/

Patrocinador Principal: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/
CPqRR/ FIOCRUZ ORGANIZACAO PAN-AMERICANA DA
SAUDE/ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE - OPAS/OMS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 274.945

Data da Relatoria: 30/01/2013

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores fazem comentários genéricos sobre a febre amarela (FA) e seu modo de transmissão, descrevem o território onde a doença ocorre no Brasil, descrevem ligeiramente o quadro clínico, referem que 10% dos casos são graves e dentre estes até 50% são letais. Referem que não ha tratamento específico para a doença, a vacina é a arma na prevenção desde 1937 e é preparada com virus atenuado. É considerada boa, confere proteção durante 10 anos e 90% dos vacinados desenvolvem anticorpos. Apesar de segura a vacina causava raros casos de encefalite, mas nas últimas décadas vem manifestando outro efeito colateral grave embora raro, com quadro clínico semelhante à FA silvestre. Está contraindicada para

pacientes alérgicos à proteína do ovo, gestantes, imunodeprimidos inclusive para portadores de doenças reumatológicas. Doentes com patologias reumáticas frequentemente são imunodeprimidos e tem alta prevalência de doenças infecciosas quando comparados com a população geral. Este trabalho será realizado com a participação de pacientes reumáticos que foram previamente vacinados contra a FA e atualmente estão usando imunomoduladores específicos. Algumas perguntas básicas foram feitas pelos pesquisadores: **O tratamento com imunomoduladores específicos modifica a imunidade humoral e celular em pacientes previamente vacinados contra a febre Amarela? Os títulos de anticorpos neutralizantes são alterados pelos imunomoduladores? As doenças reumáticas por si só, interferem na resposta vacinal contra o vírus da FA? Os pacientes dessa pesquisa serão procedentes do ambulatório de reumatologia do Hospital Universitário de Brasília, estarão usando imunomoduladores e foram vacinados contra a FA no período entre 2005 e 2009. Um grupo vacinado no mesmo período, mas sem doença reumática servirá como controle. Será exigida a carteira de vacinação, para anotar a data em que vacinou contra a FA. Será colhido sangue dos pacientes para realização em Belo Horizonte de vários exames exploratórios da imunidade humoral e celular dos pacientes.**

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos gerais: verificar se o tratamento com imunomoduladores específicos para as doenças reumáticas exerce impacto na imunidade humoral e celular, em indivíduos previamente vacinados com a vacina anti- amarilica 17DD.

Objetivos específicos: 1 - avaliar a resposta imune celular através da produção de citocinas pró- inflamatórias e reguladoras. 2 - Avaliar a produção de anticorpos neutralizantes. Correlacionar os dados obtidos como uso de imunossuppressores e com as doenças reumáticas subjacentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo não trará riscos para os pacientes, apenas a colheita de sangue podera trazer ligeiro desconforto próprio desse procedimento. Não haverá beneficios diretos para os pacientes, mas o resultado da pesquisa podera beneficiar futuros pacientes reumáticos que utilizarem a vacina contra a FA.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está delineada de maneira correta e com metodologia apropriada. O ambuatório de onde procederão os pacientes tem longa experiência no cuidado com pacientes reumáticos e é uma referência nacional. O grupo de pesquisa em biomarcadores de imunidade e resposta vacinal antiamebílica já vem trabalhando há algum tempo e já adquiriram experiência com o tema. A pesquisa é importante para os milhares de portadores de doenças reumáticas, que necessitam usar imunomoduladores por longo tempo, quicã por toda a vida e eventualmente podem necessitar de vacina contra a FA, doença que é uma realidade endêmica em nosso país. A aquisição do conhecimento é importante para responder à demanda advinda desses pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta o termo de consentimento apropriado e em linguagem acessível ao leigo, massugiro que as expressões: "Não se espera que a pessoa tenha" seja substituído por "Não se espera que você tenha". "Todos os dados referentes aos pacientes são confidenciais" por "Todos os dados referentes a você são confidenciais". Sugiro ainda que o último parágrafo do TCLE onde diz: "Declaro que recebi..." seja separado por um ou dois espaços ou por uma linha, das explicações dadas acima, para que fique configurado as explicações dadas e a decisão tomada pelo paciente. Deve-se indicar no TCLE os locais para assinatura do paciente, pesquisador e testemunhas. A Folha de rosto está preenchida adequadamente.

Recomendações:

Fazer os ajustes propostos no TCLE ou justificar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Feito os ajustes, recomendo aprovar o projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto é oportuno e importante e trará contribuição na decisão de vacinar os pacientes com doenças reumáticas. O tema é de interesse do Ministério da Saúde.

ANEXO 2- ARTIGO PUBLICADO

**Expert Review of Vaccines**

ISSN: 1476-0584 (Print) 1744-8395 (Online) Journal homepage:

<http://www.tandfonline.com/loi/ierv20>**The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences**

Clarissa de Castro Ferreira, Ana Carolina Campi-Azevedo, Vanessa Peruhype- Magalhães, Christiane Costa-Pereira, Cleandro Pires de Albuquerque, Luciana Feitosa Muniz, Talita Yokoy de Souza, Ana Cristina Vanderley Oliveira, Olindo Assis Martins-Filho & Licia Maria Henrique daMota

To cite this article: Clarissa de Castro Ferreira, Ana Carolina Campi-Azevedo, Vanessa Peruhype- Magalhães, Christiane Costa-Pereira, Cleandro Pires de Albuquerque, Luciana Feitosa Muniz, Talita Yokoy de Souza, Ana Cristina Vanderley Oliveira, Olindo Assis Martins-Filho & Licia

Maria Henrique da Mota (2018) The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences, Expert Review of Vaccines, 17:1, 79-90, DOI: [10.1080/14760584.2018.1406800](https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1406800)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1406800>



REVIEW



The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences

Clarissa deCastroFerreira^a, Ana Carolina Campi-Azevedo^b, Vanessa Peruhype-Magalhães^b, Christiane Costa-Pereira^b, CleandroPiresdeAlbuquerque^a, LucianaFeitosaMuniz^a, TalitaYokoydeSouza^a, AnaCristinaVanderleyOliveira^a, Olindo Assis Martins-Filho^b and Licia Maria Henrique da Mota^a

^aDepartment of Rheumatology, University Hospital of Brasilia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil; ^bRené-Rachou Research Center, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Brazil

ABSTRACT

Introduction: The yellow fever vaccine is a live attenuated virus vaccine that is considered one of the most efficient vaccines produced to date. The original 17D strain generated the substrains 17D-204 and 17DD, which are used for the current production of vaccines against yellow fever. The 17D-204 and 17DD substrains present subtle differences in their nucleotide compositions, which can potentially lead to variations in immunogenicity and reactogenicity. We will address the main changes in the immune responses induced by the 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines and report similarities and differences between these vaccines in cellular and humoral immunity. This is a relevant issue in view of the re-emergence of yellow fever in Uganda in 2016 and in Brazil in the beginning of 2017.

Areas covered: This article will be divided into 8 sections that will analyze the innate immune response, adaptive immune response, humoral response, production of cytokines, immunity in children, immunity in the elderly, gene expression and adverse reactions.

Expert commentary: The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines present similar immunogenicity, with strong activation of the cellular and humoral immune responses. Additionally, both vaccines have

ARTICLE HISTORY

Received 14 March 2017

Accepted 15 November 2017

KEYWORDS

Adaptive immune response; adverse reactions; innate immune response; yellow fever; yellow fever vaccine; cytokines

1. Introduction

The yellow fever vaccine is a live-attenuated virus vaccine that is considered one of the most efficient vaccines produced to date. The vaccine is one of the most applied vaccines worldwide, with more than 600 million doses distributed [1]. The vaccine was discovered by Max Theiler et al. in 1937 from a virus isolated from an African patient who was cured [2,3]. Theiler subjected the virus to 176 passages in monkey, mouse, and chicken cell cultures, which led to viral attenuation but maintained the virus's immunogenicity [2,4–6]. This original strain was named 17D.

In 1940, the World Health Organization (WHO) created a virus seed lot system to avoid immunogenetic variations in the vaccine virus that could compromise vaccine safety. The

lots consist of the preparation of a large number of virus stocks, which are currently used for the production of vaccines [7].

The original 17D strain generated the substrains 17D-204 and 17DD, which are used for the current production of vaccines against yellow fever [8,9]. Currently, there are six producers of yellow fever vaccines, but only 4 are prequalified by the WHO and international agencies: Bio-Manguinhos (Brazil), Sanofi-Pasteur (France), Pasteur Institute in Dakar (Senegal), and Institute of Poliomyelitis and Virus Encephalitis (Russia) [10].

The 17D-204 and 17DD substrains present subtle differences in their nucleotide compositions, which can potentially

lead to variations in immunogenicity and reactogenicity [9]. Approximately 99.9% of the nucleic acid sequence is identical in both strains [6]. The 17D-204 substrain was produced after 235–240 passages in embryonated chicken eggs whereas the 17DD substrain was subjected to 287 passages. The 17D-213/ 77 vaccine originated from the 17D-204 vaccine and is currently in its 240th passage [6,11].

In this article, we will address the main changes in the immune responses induced by the 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines and report similarities and differences between these vaccines in cellular and humoral immunity and adverse reactions.

2. Comparison between the immune responses induced by the 17d-204 and 17dd vaccines

The vaccine against yellow fever reproduces an acute viral infection and induces potent long-lasting humoral and cellular immune responses [1].

2.1. Innate immune responses induced by the yellow fever vaccine

Innate immunity is responsible for the initial control of infection with the yellow fever virus and induces an adaptive T and B cellular immune response with the formation of memory cells [12]. The 17D-204 vaccine stimulates the innate response through multiple Toll-like receptors (TLR), culminating in the activation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells [1,8]. The TLRs involved are TLR 2, 9, 7, 8, and 3. The MDA 5 and RIG-I receptors, which recognize RNA molecules, are also activated [13,14].

Martins et al. studied 10 healthy individuals subjected to vaccination with 17DD. Neutrophil activation was observed with increased CD28 and CD23 expression on days 7 and 15 post-vaccination. Eosinophils were also activated

with increased CD28 and human leukocyte antigen (HLA)-DR expression on day 30 post-vaccination. On day 7, there was an increase in the frequency of activated monocytes ($CD14^+CD16^{\text{high}}$) and pro-inflammatory monocytes ($CD14^+CD16^+HLA-DR^+$). Natural killer (NK) cells suffered a decrease on day 7, probably as a result of a regulatory effect, which also manifested an increased interleukin (IL)-10R (receptor) expression in a large proportion of the innate immune components on days 15 and 30 [12]. Immune system activation and modulation by innate immune responses occur simultaneously, as indicated by the positive correlation between the CD28 neutrophil levels and IL-10R expression [12]. In turn, NK cells play a central role in the initial response to the vaccine antigen by controlling viremia and contribute to dendritic cell maturation [14]. These cells are responsible for the increased expression of TLR 3 and 9 in the presence of IL-12; additionally, after contact with the 17DD vaccine, there is an increase in the expression of CD38 and CD16 on the surface of NK cells, which

characterizes the intensification of cytotoxic activity [14].

Regarding the 17D-204 vaccine, a percent increase in $CD86^+$ myeloid dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells and $CD14^+CD16^+$ inflammatory monocytes was observed on day 7 post-vaccination [15], with increased production of interferon-gamma (IFN- γ)-inducible protein-10 (IP-10) and IL-1 α . Additionally, the 17D-204 vaccine promotes the induction of a network of genes that mediate a proinflammatory antiviral response [1].

Gamma delta lymphocytes ($\gamma\delta$) are a subtype of T lymphocytes with a receptor (TCR) with a gamma and a delta chain,

which is in contrast to most T lymphocytes that have alpha and beta chains. This variation allows these cells to play roles in both innate and adaptive immunity because the recognition of antigens is major histocompatibility complex (MHC) independent, leading to quick recognition of infected cells and cytokine production [16]. After immunization with the 17D-204 vaccine, the $\gamma\delta$ lymphocytes are the first cells to produce IFN- γ , followed by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes [17,18]. The release of IFN- γ affects the maturation of dendritic cells and the polarization of CD4⁺ T lymphocytes toward a T helper type 1 (Th1) response [18].

Additionally, the 17D-204 vaccine activates the inflammasome, which is a multiprotein complex that is responsible for promoting the maturation of IL-1 β and IL-18 and inducing pyroptosis. Pyroptosis is a programmed cell death that differs from apoptosis by the release of cytokines into the extracellular space, which attracts other immune system cells and thus activates the inflammatory cascade [19]. Dendritic cells increase IL-1 β production by up to ninefold after contact with the vaccine virus [19], which is capable of regulating T helper lymphocyte activation, B lymphocyte

The 17D204 vaccine stimulates the innate response through multiple Toll-like receptors (TLR), culminating in the activation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells [1,8]. The TLRs involved are TLR 2, 9, 7, 8, and 3. The MDA 5 and RIG-I receptors, which recognize RNA molecules, are also activated [13,14].

Martins et al. studied 10 healthy individuals subjected to vaccination with 17DD. Neutrophil activation was observed with increased CD28 and CD23 expression on days 7 and 15 post-vaccination. Eosinophils were also activated with increased CD28 and human leukocyte antigen (HLA)-DR expression on day 30 post-vaccination. On day 7, there was an increase in the frequency of activated monocytes

(CD14⁺CD16^{high}) and pro inflammatory monocytes (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺). Natural killer (NK) cells suffered a decrease on day 7, probably as a result of a regulatory effect, which also manifested in increased interleukin (IL)-10R (receptor) expression in a large proportion of the innate immune components on days 15 and 30 [12]. Immune system activation and modulation by innate immune responses occur simultaneously, as indicated by the positive correlation between the CD28 neutrophil levels and IL-10R expression [12]. In turn, NK cells play a central role in the initial response to the vaccine antigen by controlling viremia and contribute to dendritic cell maturation [14]. These cells are responsible for the increased expression of TLR 3 and 9 in the presence of IL-12; additionally, after contact with the 17DD vaccine, there is an increase in the expression of CD38 and CD16 on the surface of NK cells, which characterizes the intensification of cytotoxic activity [14].

Regarding the 17D-204 vaccine, a percent increase in CD86⁺ myeloid dendritic cells, plasmacytoid dendritic cells and CD14⁺CD16⁺ inflammatory monocytes was observed on day 7 post-vaccination [15], with increased production of interferon-gamma (IFN- γ)-inducible protein-10 (IP-10) and IL-1 α . Additionally, the 17D-204 vaccine promotes the induction of a network of genes that mediate a proinflammatory antiviral response [1].

Gamma delta lymphocytes ($\gamma\delta$) are a subtype of T lymphocytes with a receptor (TCR) with a gamma and a delta chain, which is in contrast to most T lymphocytes that have alpha and beta chains. This variation allows these cells to play roles in both innate and adaptive immunity because

the recognition of antigens is major histocompatibility complex (MHC) independent, leading to quick recognition of infected cells and cytokine production [16]. After immunization with the 17D-204 vaccine, the $\gamma\delta$ lymphocytes are the first cells to produce IFN- γ , followed by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes [17,18]. The release of IFN- γ affects the maturation of dendritic cells and the polarization of CD4⁺ T lymphocytes toward a T helper type 1 (Th1) response [18].

Additionally, the 17D-204 vaccine activates the inflammasome, which is a multiprotein complex that is responsible for promoting the maturation of IL-1 β and IL-18 and inducing pyroptosis. Pyroptosis is a programmed cell death that differs from apoptosis by the release of cytokines into the extracellular space, which attracts other immune system cells and thus activates the inflammatory cascade [19]. Dendritic cells increase IL-1 β production by up to ninefold after contact with the vaccine virus [19], which is capable of regulating T helper lymphocyte activation, B lymphocyte proliferation and immunoglobulin production [13]. Campi-Azevedo et al. compared the cytokine profile produced by cells of innate immunity in children after vaccination with 17D-213/77 and 17DD. A prominent proinflammatory profile with high levels of IL-2 and tumor necrosis factor (TNF)- α production was observed by neutrophils and monocytes and TNF- α in neutrophils with the 17DD vaccine. On the other hand, the 17D-213/77 vaccine presented a profile with a regulatory tendency, with a higher expression of IL-4 and IL-10 by neutrophils [20].

In summary, both vaccines induce potent innate immunity responses by activating various types of dendritic cells and TLRs, leading to a mixed pattern of Th1 and Th2 response.

2.2. Adaptive immune responses induced by yellow fever vaccination

2.2.1. CD4⁺ and CD8⁺ T LYMPHOCYTES

After vaccination with 17DD, viremia reaches its peak on day 5, followed by a gradual reduction until day 7 [10,21]. Regarding the T lymphocyte populations, the 17DD vaccine induces a decrease in the CD8⁺CD62L⁺ T lymphocyte subpopulation on day 7 post-vaccination. Martins et al. analyzed peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) following the primary vaccination and found distinct profiles between the CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. On day 7 post-vaccination, the CD8⁺ T lymphocytes exhibited early activation markers (CD69⁺), whereas the CD4⁺ T lymphocytes exhibited late activation markers (HLA-DR) that were expressed at high levels until 30 day. The CD8⁺ T lymphocytes were activated late compared to the CD4⁺ T lymphocytes [22]. Additionally, there was a reduced frequency of CD38⁺ cells on day 30 post-vaccination, which could be justified by the increased expression of IL-10R on day 15 in the CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes [22]. IL-10 inhibits proinflammatory cytokine production and T lymphocyte proliferation [23].

Santos et al. studied a group of 8 individuals who were immunized with the 17DD vaccine for the first time and 9 revaccinated individuals. The authors found an increase in the frequency of CD8⁺CD38⁺ T lymphocytes (activation markers) in all volunteers. The revaccinated individuals presented greater levels of CD4⁺CD45RO⁺ and CD8⁺CD45RO⁺ T lymphocytes than the group of first-time vaccinated individuals, which suggested a quicker immune response after revaccination [24].

The immune system activation and modulation events generated by the yellow fever vaccine occur simultaneously. On day 7 post-vaccination, there was a positive correlation between CD4⁺HLA-DR⁺ and regulatory CD4⁺CD25^{high} T lymphocytes. The regulatory CD4⁺CD25^{high} T lymphocytes produce the anti-inflammatory cytokines IL-10 and transforming growth factor (TGF)[22].

Similarly, the 17D-204 vaccine induces quick expression of CD8⁺Ki-67⁺ T lymphocytes, which promotes a reduction in the BCL-2 level and favors apoptosis [1,19]. High proliferation of CD8⁺ T lymphocytes occurs during the first 15 days post-vaccination; these lymphocytes express HLA-DR and CD38 (representative of differentiation into effector cells) and account for 2–13% of all CD8⁺ T lymphocytes[25]. On day 30 post-vaccination, a loss of the effector phenotype is observed, with reduced Ki-67 expression and transformation of memory cells expressing BCL-2, CD127, and CD45RA. The CD8⁺ memory cells are classified according to the expression of CD45RA and CCR7 into central memory cells (CD45RA⁻CCR7⁺), effector memory cells (CD45RA⁻CCR7⁻) and terminally differentiated effector cells (CD45RA⁺CCR7⁻). Most memory CD8⁺ T lymphocytes are of the CD45RA⁺CCR7⁻ type, which typically has lower proliferative potential. However, the CD8⁺ T lymphocytes specific for the vaccine virus present a high multiplication capacity [25–27]. Blom et al. analyzed 21 individuals vaccinated with 17D-204 to evaluate the kinetics of the CD8⁺ T lymphocytes and observed a transition of effector CD45RA⁻PD-1⁺ cells into memory CD45RA⁺PD-1⁻ cells (PD-1 is a surface marker that induces apoptosis). This transition occurred gradually from day 15 to day 90 post-vaccination [21,28]. CD8⁺ T lymphocytes present a broad and complex response to multiple epitopes, of which the most common is the HLA-A2 restricted epitope NS4b (a

nonstructural protein encoded in viral RNA genome) [28,29]. Similarly, there is a correlation between the magnitude of the activation of CD8⁺ T lymphocytes and the viral load (i.e. a higher viral load indicates a greater intensity of effector CD8⁺ T lymphocytes until saturation is reached)[21].

CD8⁺ T lymphocytes play multiple roles, including direct cytotoxic action and secretion of antiviral cytokines, such as IFN- γ , TNF- α , IL-2, and macrophage inflammatory protein 1 β [26]. The direct action occurs through the action of the perforin and granzyme A and B molecules. These cells acquire cytotoxic potential by day 12, which remains for up to 6 months post-vaccination [29]. Additionally, a single dose of the vaccine is capable of generating memory CD8⁺ T lymphocytes for 5–10 years regardless of reexposure to viral antigens [27].

In the 17D-204 vaccine, the CD4⁺ T lymphocytes initially decreased in association with the peak viremia but increased during the second week [30,31]. The activation of CD4⁺ and regulatory T (Treg) lymphocytes preceded the activation of CD8⁺ T lymphocytes [28]. These CD4⁺ T lymphocytes were predominantly IFN secreting and CD45RA⁻CXC3⁺ [32] and presented significant expansion on day 14 post-vaccination; a transition from the effector phenotype to the central memory phenotype was observed after 1 month[32].

Campi-Azevedo et al. demonstrated a significant increase in effector T lymphocytes in volunteers 30–45 days after primary vaccination with 17DD compared to non-vaccinated individuals. When analyzing subjects whose vaccination had occurred 10–11 years ago, there was a decrease in the TNF- α levels

secreted by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and an increase in CD4⁺ IL-10⁺ T lymphocytes compared to the newly vaccinated group (30–45 days post-vaccination). Increased production of IL-10 and reduction of proinflammatory cytokines in this group suggests that, over time, there is a tendency to balance between proinflammatory versus regulatory response. Besides, the early effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells as well as the classical memory B cells and the median PRNT (plaque reduction neutralizing titers) titers are decreased 10–11 years post-vaccination, which may indicate a fragility of the effector response in the time [33]. These data suggest that the non-booster recommendation may need to be reviewed. This is a controversial issue with disparate results in different studies. Wieten et al., in turn, concluded that the booster did not promote increases in frequency or phenotypic changes in specific CD8⁺ cells or increase in antibody titers [29]. However, the authors did not analyze the CD4⁺ T cell response and there was decay of antibody titers overtime.

In a similar study, Kongsgaard et al. concluded that the response of CD8⁺ T cells from booster recipients was smaller compared to primary vaccination [34]. Both studies were performed with the 17D-204 vaccine. These disparate findings could be attributed to the vaccine strain, but are possibly more related to immunogenetic variations of the populations studied, given the study by Muyanja et al. who analyzed the immunological response to the 17D-204 vaccine in 2 distinct populations: the African and Swiss cohort [35]. The African cohort presented a cellular and humoral response significantly lower than that of the Swiss cohort. The authors attributed the fact to a chronic activation of the immune system present in the African cohort, being more exposed to viral, bacterial and fungal antigens. In the African cohort, T and B cell responses were boosted by a second vaccination [35].

Yellow fever vaccines induce a specific CD8⁺ T memory cell response with polyfunctional and high proliferative capacity. This is also found in other live virus vaccines, such as smallpox vaccine [26]. In inactivated vaccines, for example the inactivated influenza vaccine, the induction of a potent CD8⁺ T cell response has not been observed, with a more detectable increase in influenza-specific Th1 CD4⁺ T-helper cell response [36].

2.2.2. BLYMPHOCYTES

Studies show a balance between activation and modulation of the cellular immunity induced by the 17DD vaccine. The CD19⁺ B lymphocyte levels were decreased on day 7 post-vaccination for yellow fever, which led to a relatively larger proportion of T lymphocytes during this period [22]. On day 15 post-vaccination, an increase in B lymphocytes with an early activation phenotype (CD19⁺CD69⁺ cells), and increased IL-10R expression were observed, which favored the proliferation and maturation of B lymphocytes [20,37]. Increased frequency of IL5⁺ T cells was also observed on days 15 and 30 post-vaccination with 17DD, which facilitates the activation of B cells [37]. Conversely, regulatory markers, such as increased CD32 expression and decreased CD19⁺CD23⁺ cell percentages, were also observed. CD32 is a membrane receptor that inhibits the production of antibodies in the presence of IgG [20]. CD23 is a B lymphocyte-specific antigen that indicates cellular activation [38]. Campi-Azevedo et al. also demonstrated a significant increase in classical memory B lymphocytes in volunteers 30–45 days after their primary vaccination with 17DD compared to unvaccinated individuals [33].

Regarding the 17D-204 vaccine, Kohler et al. demonstrated a reduction in the number of B lymphocytes on day 7, followed by a subsequent increase until day 14 and then a gradual return to the pre-vaccination levels[31].

After re-encounter with antigen, as documented after vaccination with the inactivated influenza vaccine, memory B cells differentiate into plasma cells that secrete IgG antibodies and undergo secondary affinity maturation to influenza epitopes. Compared to the inactivated vaccine, the live influenza vaccine induces a more intense B cell response [36].

2.3. Humoral response induced by yellow fever vaccination

Vaccination with 17D-204 produces neutralizing antibodies that can last 30–40 years [1,8,29,39,40]. IgM antibodies appear after day 7 and reach a peak after 2 weeks, followed by the emergence of neutralizing antibodies [27]. However, IgM antibodies can be found 3–4 years post-vaccination [41], and the seroconversion rates range from 89.7 to 98.2% [40,42].

Neutralizing antibodies have the function to neutralize the viral particle and prevent its entry into the cell. They are considered the main mechanism of protection and are directed to complex epitopes found at the virion surface [43]. After vaccination, they arise in about 6 days, peaking within 2 weeks [44]. PRNT is the gold standard method to detect neutralizing antibodies, while ELISA analyzes the total of neutralizing and non-neutralizing antibodies. In order to evaluate protection, dose–response studies in rhesus monkeys showed \log_{10} neutralization index (LNI) >0.7 as a protector marker against yellow fever. There are no human studies. However, the US FDA considers the above value as protective. The PRNT test, which uses a known concentration of virus and several serum dilutions, replaced the LNI. In

general, 1:10 and 1:20 titers are often used as cutoff in most studies [40].

Antibodies confer protection through various mechanisms, including direct cytotoxicity, complement-mediated lysis of infected cells, viral fusion inhibition, neutralization of virus binding to the cell receptor, and Fc- γ receptor-dependent viral clearance[45].

Melo et al. studied 238 healthy volunteers submitted to vaccination against yellow fever with the 17DD vaccine. In that study, 100% of the individuals developed a protective humoral response, with PRNT titers $\geq 1:20$ [6]. Melo et al. also measured the PRNT titers in individuals who were vaccinated 5 and 10 years earlier; the results showed decreases in the PRNT titers of 83 and 87%, respectively, compared with recently vaccinated individuals, with PRNT titers in the range of 20–320, although they remained positive[6].

Reinhardt et al. detected neutralizing antibodies in all volunteers submitted to vaccination with 17D-204 during the second week post-vaccination, with average titers of 1:88. After 10 years, the antibody titers decreased by 18%, nevertheless showing high neutralizing antibodies titers 10 years after primary vaccination[30].

Camacho et al. published a randomized, double-blind, placebo-controlled study comparing the 17D-204 and 17DD vaccines. A total of 1087 volunteers were recruited, and the seroconversion rates were the same in approximately 98% of the participants. The mean and median antibody titers were also similar between the vaccine groups. The antibody titer was measured with the PRNT and seropositivity was defined as neutralizing antibody titer equal to or higher than

630 mIU/ml[46]. These data show that there are no significant differences in the humoral immunity triggered by the yellow fever vaccine strains 17DD and 17D-204.

2.4. Cytokines and chemokines

Cytokine production occurs early and strongly from day 5 to 7 post-vaccination with the 17DD vaccine. Simultaneous to the peak viremia, there is a peak in the production of the proinflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α , and IL-2 [47]. In turn, the regulatory cytokine levels gradually increase, with a peak on day 30 (IL-4 and IL-5; the exception is IL-10, whose increase occurs early on day 3, followed by a decrease on day 5 and another increase between days 6 and 7). The decrease in the IL-10 levels during peak viremia should allow the development and maturation of antigen-presenting cells and increased MHC expression [20].

Querec et al. studied the early changes in cytokines in 15 individuals vaccinated with the 17D-204 vaccine on days 0 to 21 post-vaccination. The authors observed a significant increase in the chemokine IP10 (CXCL10) and IL-1 α during all periods [15].

According to Martins et al, the CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes exhibited increased expression of CXCR3 [22], which is a chemokine receptor involved in the Th1 response (particularly the recruitment of T lymphocytes) on day 15 post-vaccination with the 17DD vaccine [48]. However, on day 30 post-vaccination, increased expression of CCR2 by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes characterized a Th0 response with a mixed pattern of cytokines [22]. This pattern was persistent and was found up to 1 year post-vaccination [19].

The innate immune cells also presented a mixed pattern of cytokine production, with

increased CCR3 (Th2), CCR5 (Th1), and CCR4 (Th0) by neutrophils on day 7 post-vaccination with 17DD[12].

2.5. Gene expression

Vaccination with the 17D-204 vaccine quickly induces modulation of genes that orchestrate the innate and cellular immune responses. The gene expression peak occurs at 7 days post-vaccination [19].

Querec et al. studied 15 individuals vaccinated with 17D-204 and found 65 genes modulated by the yellow fever vaccine. Of these 65 genes, 44 were identified. The main genes involved were related to the production of interferon and the antiviral response of the innate immune system, such as IRF7, STAT1 (transcription factors that regulate type I interferons), TLR7, RIG-I, MDA-5 (associated with viral recognition), and genes related to complement activation, ubiquitination or ISGylation (protein modification through the addition of IFN-stimulated gene products)[15,19].

Scherer et al. analyzed the gene expression of polymorphonuclear cells of 20 individuals vaccinated with 17D-204 to determine the gene signature of the yellow fever vaccine. This study identified 615 genes that were induced or suppressed during the period from 4 to 7 days post-vaccination [49]. These genes were related mainly to immune biological processes, such as protein synthesis, apoptosis, signal transduction, and transcription control. The main genes induced were associated with interferon, such as OAS1, OAS2, MX1, MX2, ISG15, and IFIT3 [49]. Figure 1 illustrates the main immunological changes caused by yellow

fever vaccines. Figure 2 summarizes these main immunological events plotted on a timeline.

2.6. Immunity in children

groups; the lowest values were observed in children 9–11 months of age [50]. A study conducted in Ghana showed seroconversion rates of 68–79% with 17DD vaccine in children 9 months of age, 4 weeks post-vaccination. A similar trial carried out in Mali, but with the 17D-204 vaccine, showed higher seroconversion rates of 95.1–98.3% [51]. This can be explained by the variation in the amount of viral particles in each vaccine [4.34–4.56 log₁₀ plaque-forming unit (PFU) in the 17DD vaccine and 4.5–4.7 log₁₀ PFU in the 17D-204 vaccine] [51]; however, both had a viral particle

concentration above the WHO recommended minimum of 3.0 Log₁₀ PFU [11]. Factors that may be associated with the lower seroconversion rates in children include immune system immaturity, the presence of maternal antibodies, and the combined application of the yellow fever and MMR (measles, mumps, and rubella) vaccines [52]. Recently, Clarke et al conducted a study to evaluate safety and immunogenicity of the simultaneous application of inactivated poliovirus vaccine along with measles-rubella combined vaccine and yellow fever vaccine [53]. There is no report on which strain of the yellow fever vaccine was used. The seroconversion rates ranged from 95 to 97%; however, the median antibody titers were much lower in the combined application of the vaccines when compared to the isolated application of the yellow fever vaccine [64(95% CI 45–64) × 128(95% CI 91–128)] [53]. This is an important finding with regard to the recent WHO recommen-

Seroconversion is usually lower in children than in adults [9]. An observational study of the 17DD vaccine showed seroconversion rates of 67–94% with differences between age

groups; the lowest values were observed in children 9–11 months of age [50].

Luiza-Silva et al. studied 60 healthy children aged 9–43 months who received the 17DD vaccine. Serum analyses 30 days after vaccination showed increased synthesis of IL-12 and TNF- α by neutrophils and monocytes in the seroconverted children. Additionally, a decrease in IL-4 production can be considered to promote a proinflammatory environment. Conversely, the group that did not achieve seroconversion presented cytokine patterns that were predominantly regulatory, with increased synthesis of IL-5 and IL-10 by CD8⁺ T lymphocytes [55]. The group that did not achieve seroconversion was subjected to revaccination, and a change in the cytokine profile was noted, with increased proinflammatory cytokine production.

The cytokine profile correlates with the humoral response. High neutralizing antibody levels are associated with a proinflammatory pattern (IL-12 produced by neutrophils and monocytes and IFN- γ produced by neutrophils), whereas the median levels are associated with a balanced pattern of inflammatory and regulatory cytokines [55].

Cytokine production is due in large part to innate immune cells, which are represented by neutrophils and monocytes. Differences in these cell types were noted between the groups that achieved and did not achieve seroconversion; in the latter group, the synthesis of cytokines by neutrophils and monocytes was impaired. Interestingly, 100% seroconversion was achieved

with revaccination, resulting in a change in this scenario, with additional synthesis of cytokines by neutrophils and monocytes [55].

Campi-Azevedo et al. compared the immunogenicity of the 17DD vaccine and the 17D-213/77 vaccine (derived from the 17D-204 strain) in 80 children. Both strains showed a balance between the production of inflammatory and regulatory cytokines, with the 17DD vaccine showing a predominance of IL-12 and the 17D-213/77 vaccine showing a slight predominance of IL-10 production [20]. The innate immune response was more intense in the group vaccinated with 17DD, resulting in high synthesis of IL-12 and TNF- α . In turn, the 17D-213/77 vaccine presented greater IL-12 production by CD8⁺ T cells. There were no differences in the production of neutralizing antibodies between the groups. However, the subgroup with higher neutralizing antibody titers in response to the 17DD vaccine had a proinflammatory cytokine profile, which was in contrast to the 17D-213/77 vaccine group in which a regulatory profile predominated. Similar to the observations in the study of Luiza-Silva et al., individuals who did not achieve seroconversion presented a production deficit of proinflammatory cytokines; this scenario was reversed by revaccination with 17DD [20].

These small variations are probably due to genetic changes arising from viral passages in embryonated chicken eggs [9]; however, both vaccines are highly immunogenic.

2.7. Immunity in the elderly

Immunosenescence is aging of the immune system, which contributes to a

lower response to antigens, vaccines, and infections in the elderly. The adaptive immune response is the most affected, with a decrease in the T lymphocyte repertoire and an increase in late memory and effector cells [56]. Other changes include decreased B lymphocyte levels and increased NK cell and myeloid dendritic cell levels [56]. These changes are responsible for a greater risk of adverse reactions in the elderly, including yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease (YEL-AVD), whose incidence is 2.3–3.2:100,000 in those older than 70 years of age [57].

Myaji et al. conducted an observational and prospective study to investigate adverse effects related to the 17DD yellow fever vaccine in 828 elderly individuals. The results showed the occurrence of only mild adverse effects in approximately 15% of the participants [58].

These results corroborate the findings of Thomas et al., who assessed studies using pharmacovigilance databases through a systematic review but did not find a large number of serious adverse events in the elderly. In the reported cases, another vaccine in addition to the yellow fever vaccine had been applied concomitantly in approximately 50% of the cases [59]. Roukens et al. conducted a prospective controlled study to analyze the humoral response and viremia after vaccination with 17D-204. In that study, young volunteers (18–28 years) were compared to elderly individuals (60–81 years) [57]. On day 10 post-vaccination, 77% of the young people presented neutralizing antibodies compared to only 50% of the elderly. There was a significant difference in neutralizing antibody titers between the groups. On average, these titers were 2.9 UI/mL higher among the young people on day 10, although the titers reached levels similar to those observed in the elderly on day 28. The elderly group presented higher viremias for more prolonged periods [57].

Similarly, Schulz et al. when analyzing the elderly immune response to 17D-204 vaccination, found a late viremia (days 7–10) compared to young individuals, probably due to a slowed viral clearance. The elderly also had a transient reduction in neutralizing antibody titers [60]. The number of CD8⁺ T cells was also reduced in the acute phase. CD4⁺ T cells, on the other hand, showed late expansion until day 14 post-vaccination, which may characterize an exaggerated or prolonged response, facilitating undesirable adverse reactions. There was maintenance of protective levels of antibodies after 3 years; however, the population of IFN- γ ⁺ CD40L⁺ CD4⁺ T cells was significantly smaller compared to younger ones, with lower polyfunctionality [60]. These results suggest that, in the elderly, the immune response is deficient, and that this group would probably benefit from a booster vaccination.

3. Adversereactions

The 17D-204 vaccine is quite safe, and serious adverse reactions are rare (1 per 250,000 or 500,000 vaccinations) [1]. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease (YEL-AVD) and neurotropic disease (YEL-AND) are part of this spectrum. The former consists of a clinical picture very similar to yellow fever, with multiple organ failure and high lethality (approximately 60%). In a recent review, 62 YEL-AVD reports were identified that met the Brighton Collaboration criteria. Of these, 35 died [61]. The neurotropic disease is characterized by involvement of the central nervous system, such as encephalitis and Guillain-Barré syndrome. The most likely explanation for these adverse reactions is individual genetic susceptibility because

no mutations have been found in the vaccine virus [1,62]. Cases of YEL-AVD in thymectomized individuals and polymorphisms in the OAS1 and OAS2 genes and in the CCR5-RANTES axis have been reported [62]. The main defect seems to focus on innate immunity because in all cases, individuals have high neutralizing antibody titers and a strong cellular immuneresponse.

Pulendran et al. reported the case of a 64-year-old man who developed YEL-AVD two days after receiving the 17D-204 vaccine. Serum analysis detected viral RNA up to 33 days post-vaccination, whereas viral clearance in healthy individuals occurs within 7 days on average. The persistence of the viral RNA was not due to changes in the adaptive response, which was quite consistent. In this case, there was a polymorphism in the CCR5 chemokine receptor and its ligand RANTES, which are responsible for the migration of effector T lymphocytes and CD14⁺CD16^{bright} monocytes to tissues; this polymorphism may have compromised the innate immune response[63].

Silva et al. studied the serum of a young 23-year-old female who presented with YEL-AND after vaccination with 17D-204 [64]. On day 8 post-vaccination, the patient has evolved with encephalitis, rhabdomyolysis, and hepatitis. Polymorphonuclear cells in the peripheral blood were analyzed, and the results were compared to healthy volunteers. The patient in question showed a greater NK cell level and less CD16 expression in monocytes. Additionally, there was a higher rate of activated CD4⁺T lymphocytes and a low level of regulatory T lymphocytes [64]. The B lymphocytes were also more activated compared to the healthy volunteers, but reduced CXCR3 expression was observed in the CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes. The proinflammatory pattern also manifested in the production of cytokines, with increased IL-12 and TNF- α and low production of IL-10, IL-4, and IL-5 [64].

In order to assess the chance of an individual developing YEL-AVD, Seligman et al. analyzed 64 cases in which gender and age were known. The greatest risk factor associated with YEL-AVD was the presence of thymoma (OR = 140.0 95% CI = 34–540), men over 55 years old (OR = 10.0 95% CI = 6.4–17), patients with autoimmune diseases (OR = 6.0 95% CI = 3–12), and young women (OR = 2.8, 95% CI = 1.6–4.9)[65]. A randomized, placebo-controlled study compared the reactogenicity of the 17D-213/77 vaccine with two virus seed lots of the 17DD vaccine [7]. A total of 1087 volunteers were vaccinated and observed for 30 days for viremia analysis and measurement of liver enzymes. No serious adverse events occurred. The most common adverse reaction was pain at the injection site. Fever, myalgia, and headache also occurred with similar frequencies between the groups. The rate of adverse events ranged from 17.8 to 21.7% in the vaccine group and was 14.3% in the placebo group [7].

Serious adverse events following immunization are quite rare. In large part of the reports it is difficult to establish the causal link with the vaccine, and it is easier to detect the temporal relation between the administration of a vaccine and its adverse effects. Some well-documented serious adverse events are Guillain-Barré syndrome, whose estimate would be 1.6 per million cases following influenza vaccination; apnea in preterm newborns, which has been associated with inactivated polio virus vaccine, hepatitis B virus vaccine and diphtheria-tetanus-whole-cell pertussis; and immune thrombocytopenic purpura, whose incidence

following MMR vaccine is 1:40,000 cases [66].

Table 1 summarizes the above comparisons for both yellow fever vaccines.

4. Conclusion

The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines present similar immunogenicity, with strong activation of the cellular and humoral immune responses. The vaccines induce the production of neutralizing antibodies and confer protection that manifests as a strong and polyfunctional cellular response with amplification potential. Additionally, both vaccines are considered safe since they have similar adverse effects, which are mostly mild. The vaccines 17DD and 17D-204 show subtle differences between them.

5. Expert commentary

Yellow fever vaccines have been in use for many decades, with excellent results and countless lives saved.

In 2016, there was a large yellow fever epidemic in Angola, and the yellow fever vaccine stock was shortly exhausted culminating with the interruption of routine immunization in this endemic area of Africa. Moreover, the yellow fever outbreak in Brazil also required a large amount of yellow fever vaccine doses to cover the areas at risk. Considering the limited capacity of worldwide producers to supply these increasing demands, alternative strategies have become needed. Amongst these measures, the use of fractionated doses and reevaluation of booster dose requirement were implemented. The use of fractionated doses have been originally addressed by two studies carried out in Brazil by Martins et al., 2013 and Campi-Azevedo et al. [47,70]. Together, these studies provided supporting evidences that, upon primary vaccination, ten-fold lower subdose of yellow fever vaccine induced similar immunological and virological pattern.

These findings led to the World Health Organization and the Center for Disease Control (USA) to design a field study of fivefold fractionated dose in Angola [71]. Based on these results, dose fractionation has become a strategy used only in emergency situations if there is a lack of yellow fever vaccine stocks. It is an off-label use of the vaccine [72]. In this scenario, it would be interesting to review the non-necessity booster recommendation since the magnitude of the CD8 response is proportional to the amount of antigen present [21]. Additional gaps still need to be overcome, such as the vaccination of immunosuppressed individuals. Yellow fever vaccines contain live virus; therefore, their use is contraindicated in immunosuppressed patients because of the risk of uncontrolled viral replication. Due to ethical considerations, few controlled studies of such vaccines that include immunosuppressed individuals have been performed.

In the literature, there exist observational and retrospective studies involving HIV-positive individuals; the largest such investigation examined a cohort of 364 HIV-positive individuals [73] who underwent 17D-204 immunization. In this cohort, only 9 subjects did not achieve protective titers. Individuals with high viral loads and lower CD4 levels were more likely to exhibit lower antibody production. All 14 subjects in the subgroup with $CD4 < 200$ cells/mm³ had protective antibody titers. There were no reports of serious adverse events. The yellow fever vaccine is considered to be effective in HIV-positive individuals but exhibits mildly impaired immunogenicity in such individuals relative to non-HIV-infected individuals. This can be explained by an aberrant

activation of the B cells or low T-helper response promoted by HIV infection. Antiretroviral therapy may improve the protective response to the yellow fever vaccine by reducing the activation of the immune system and improving immune cellular response [74]. Similar studies have produced similar results, leading to a recommendation to vaccinate HIV-positive individuals who are exposed to high-risk areas and have CD4 levels greater than 200 cells/mm³. Ideally, these individuals should be on highly effective antiretroviral therapy and/or have undetectable HIV RNA [74].

With respect to transplant recipients, even fewer studies exist; such investigations include only case series, the largest of which involved 19 cases [75]. No adverse effects were reported, but no antibody measurements were performed. Observational studies of individuals using immunosuppressive drugs have been conducted; however, these investigations have involved small samples. For instance, Oliveira et al. evaluated 31 patients diagnosed with inflammatory rheumatic diseases who were using immunosuppressants [76], such as methotrexate, leflunomide, infliximab, hydroxychloroquine, and rituximab. Overall, 87.1% of these patients had protective titers of neutralizing antibodies. In that study, no serious adverse effects were observed. These investigations point to the need for larger studies of immunosuppressed individuals to assess safety. However, it is known that risks and benefits should be weighed when deciding whether to vaccinate an immunosuppressed patient because there is no effective treatment for yellow fever, which is highly lethal. The development of an inactivated vaccine would probably reduce the severe side effects; however, still there are no information about the long-lasting protective immunity. Ongoing animal studies [77–81] have shown that such vaccines result in lower level of neutralizing antibodies than live virus vaccines but high survival rates in viral exposure tests.

High hydrostatic pressure has been described to abolish yellow fever virus infectivity and eliminated the ability of the virus to cause disease and represent an alternative strategy to produce safe vaccine to be use on immunosuppressed patients. However, pressure-inactivated 17DD vaccine virus elicited low level of neutralizing antibody titers although exhibited complete protection against an otherwise lethal challenge in murine model [81].

Innovative insights have also gained strength as nonviral DNA-based vaccine formulations. Preliminary reports have characterized the DNA-based vaccine expression and its immunological properties, suggesting that DNA-based vaccine candidates should be considered for further developmental studies [82].

6. Five-yearview

In the next 5 years, studies on inactivated yellow fever vaccines will likely become consolidated with the development of phase II, III, and IV studies. Safety and immunogenicity issues, such as the number of doses required for immunization and the duration of protection, should be addressed.

Observational studies with representative samples that analyze the cellular and humoral immune responses of immunosuppressed individuals who receive 17D-204 or 17DD vaccination will help pave the way for additional

post-vaccination; a transition from the effector phenotype to the central memory phenotype was observed after 1 month

The 17D-204 and 17DD vaccines are quite safe, and serious adverse reactions are rare (1 per 250,000 or

scientific knowledge and will support difficult decisions regarding whether to vaccinate immunocompromised individuals residing in or traveling to endemic areas.

Considering the expansion of yellow fever virus circulation in areas at risk of transmission, alternative strategies has become urgent to overcome the increasing need for yellow fever vaccine supply worldwide. The reevaluation of booster dose requirement and the use of fractionated doses have been implemented.

Key issues

- The yellow fever vaccine is a live attenuated virus vaccine that is considered one of the most efficient vaccines produced to date.
- The original 17D strain generated the substrains 17D-204 and 17DD, which are used for the current production of vaccines against yellow fever.
- The 17D-204 and 17DD substrains present subtle differences in their nucleotide compositions, which can potentially lead to variations in immunogenicity and reactivity.
- The vaccine against yellow fever reproduce an acute viral infection and induce potent long-lasting humoral and cellular immuneresponses.
- In the 17D-204 and 17DD vaccines, the CD4⁺ T lymphocytes initially decreased in association with the peak viremia but increased during the second week. The activation of CD4⁺ and Treg lymphocytes preceded the activation of CD8⁺ T lymphocytes. These CD4⁺ T lymphocytes were predominantly IFN-secreting and presented significant expansion on day 14. The immune system activation and modulation events generated by the yellow fever vaccine occur simultaneously.
- Yellow fever vaccines produce neutralizing antibodies that can last 30–40 years. The seroconversion rates that can last 30–40 years. The seroconversion rates range from to 98.2% in adults and 67–94% in children

500,000 vaccinations). Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease (YEL-AVD) and neurotropic disease (YEL-AND) are part of this spectrum.

- The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines present similar immunogenicity, with strong activation of the cellular and humoral immune responses. The vaccines induce the production of

neutralizing antibodies and confer protection that manifests as a strong and polyfunctional cellular response with amplification potential.

- Current gaps that should be shortly addressed based on the increasing demand for yellow fever vaccine supply worldwide include validation studies for using fractionated doses, especially regarding the duration of protective immunity in a long term fashion.
- A critical issue regarding protective immunity induced by yellow fever caused by wild type virus still remains to be elucidated.
- Systematic studies focusing on particularities of immune response amongst children and adults are required to support the need of booster doses to guarantee long lasting protecting immunity induced by yellow fever vaccine.

Funding

The manuscript was not funded.

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

ORCID

Clarissa de Castro Ferreira  <http://orcid.org/0000-0003-2436-3802>

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

1. Pulendran B, Oh JZ, Nakaya HI, et al. Immunity to viruses: learning from successful human vaccines. *Immunol Rev.* 2013;255(1):243–255.
 - A very interesting article that dissects the immunological changes of the 17D vaccine and outlines new possibilities for immunological response pathways.
2. Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. *JAMA.* 2008;300(8):960–962.
3. Norrby E. Yellow fever and Max Theiler: the only Nobel Prize for a virus vaccine. *J Exp Med.* 2007;204(12):2779–2784. Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. *J Exp Med.* 1937;65(6):787–800.
4. Bres PL. A century of progress in combating yellow fever. *Bull World Health Organ.* 1986;64(6):775–786.
5. de Melo AB, da Silva MP, Magalhaes MC, et al. Description of a prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(4):739–747.
6. Camacho LA, De Aguiar SG, Freire MS, et al. Reactogenicity of yellow fever vaccines in a randomized, placebo-controlled trial. *Revista de Saude Publica.* 2005;39(3):413–420.
 - Important to compare head-to-head 17D and 17DD vaccines.
7. Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: a reemerging threat. *Clin Lab Med.* 2010;30(1):237–260.
8. Fernandes GC. Imunogenicidade e reatogenicidade das vacinas contra febre amarela: implicações para o Programa Nacional de Imunizações. [Thesis]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2010.
9. Reemergência da Febre Amarela Silvestre no Brasil. 2014/2015: situação epidemiológica e a importância da vacinação preventiva e da vigilância intensificada no período sazonal [Reemergence of sylvatic yellow fever in Brazil, 2014/2015: epidemiological status and importance of preventive vaccination and increased surveillance in the seasonal period]. In: Saúde, editor. *Boletim Epidemiológico Ministério da Saúde (BR) [Epidemiological bulletin of the health ministry]*. Vol. 46; 2015. p.1–10. Portuguese.
10. World Health Organization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of live attenuated yellow fever vaccines. Edited by WHO. Geneva: Switzerland; 2010.
11. Martins MA, Silva ML, Eloi-Santos SM, et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine.* 2008;26(9):1173–1184.
 - Study that reports the events in innate immunity post-vaccination.
12. 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.
13. Neves PC, Matos DC, Marcovistz R, et al. TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. *Vaccine.* 2009;27(41):5543–5549.
14. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol.* 2009;10(1):116–125.
15. Kabelitz D, Wesch D. Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors. *Crit Rev Immunol.* 2003;23(5–6):339–370.
16. Neves PC, Rudersdorf RA, Galler R, et al. CD8+ gamma-delta TCR+ and CD4+ T cells produce IFN-gamma at 5–7 days after yellow fever vaccination in Indian rhesus macaques, before the induction of classical antigen-specific T cell responses. *Vaccine.* 2010;28(51):8183–8188.
17. Neves PC, Santos JR, Tubarao LN, et al. Early IFN-gamma production after YF 17D vaccine virus immunization in mice and its association with adaptive immune responses. *PLoS One.* 2013;8(12). DOI: 10.1371/journal.pone.0081953
18. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and

polyfunctional immune responses. *J Exp Med.* 2008;205(13):3119–3131.

- Defines the signature of the immune response to 17D-204 yellow fever vaccine.
19. Campi-Azevedo AC, De Araujo-Porto LP, Luiza-Silva M, et al. 17DD and 17D-213/77 yellow fever substrains trigger a balanced cytokine profile in primary vaccinated children. *PloS One.* 2012;7(12). DOI:[10.1371/journal.pone.0049828](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049828).
- Very interesting article which compares the cytokine signature of 17D-204 and 17DD vaccines.
- 1.

Table 1. Comparison between the 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines.

| | | 17D-204 | 17DD |
|------------------------|---|--|--|
| | Humoral response rates, approximately 98% | | |
| | Seroconversion | Equivalent seroconversion rates, approximately 98% | Equivalent seroconversion |
| | GMT (geometric mean titers) PRNT titers 30 days | 17.6 IU/ml [46] observation: this was a head-to-head study comparing 17D and 17DD vaccines | 17.7 IU/ml [46] observation: this was a head-to-head study comparing 17D and 17DD vaccines |
| Innate response | PRNT titers after 10 years | GMT titers: 9.81 IU/ml [29] Stimulation of multiple toll-like receptors (TLRs), culminating in the activation of myeloid and plasmacytoid dendritic cells | 65% had a titer $\geq 1:10$ [6] Neutrophil activation on days 7 and 15 post-vaccination. Eosinophils were also activated on day 30 post-vaccination. On day 7, there was an increased frequency of activated monocytes. |
| T lymphocyte responses | | Proliferation of CD8 ⁺ T lymphocytes in the first 15 days post-vaccination, with expression of HLA-DR and CD38. On day 30 post-vaccination, there was a loss of the effector phenotype and transformation in memory cells CD4 ⁺ T lymphocytes initially decreased associated with the peak viremia, followed by an increase in the second week. | Decrease of the CD8 ⁺ CD62L ⁺ T lymphocyte subpopulation on day 7 post-vaccination. The CD8 ⁺ T lymphocytes exhibited early activation markers (CD69 ⁺), whereas the CD4 ⁺ T lymphocytes exhibited late markers activation (HLA-DR), which remained at high levels until day 30. Increase of effector T lymphocytes 30–45 days post-vaccination. |
| | CD4 ⁺ | CD4 ⁺ T cells present a biphasic appearance with transient increase on day 2, decrease on day 3 and reappearance on days 4–7. Secretion of IL-2, TNF- α and IFN- γ [31]. | CD4 ⁺ T cells are activated earlier than CD8 ⁺ and are closely related to modulator events mediated by Treg [22]. |
| | CD8 ⁺ | CD8 ⁺ T cells naïve undergo clonal expansion and differentiate to acute-phase T cells on 12–14 days after vaccination. They develop into late differentiated T cells on days 90–180 with cytotoxic potential preserved. [29,31] | There is an increase in progressive CD8 ⁺ T-cell level up to the 30th day post-vaccination, with 70% of these cells being identified as memory cells [24]. |
| B lymphocyte responses | | Decrease in the number of B lymphocytes on day 7 followed by a subsequent increase until day 14, after which there was a gradual return to pre-vaccine levels. | Balance between activation and modulation. CD19 ⁺ B lymphocytes were quite decreased on day 7 post-vaccination. On day 15, there was an increase in the early activation B lymphocytes. |
| Adverse effects | | Mild: headache, myalgia, local pain, and fever. Serious reactions are rare (1 per 250,000 or 500,000 doses) | Mostly mild. |
| | Hypersensitivity reactions | 1.8 per 100,000 doses [67] | 0.76 per 100,000 doses [68] |
| | YEL-AND | 4–8 per million doses [67] | 5.6 per million doses [69]. |
| | YEL-AVD | 3,1–3,9 per million doses [61] | 0.19 per million doses – probably underestimated [61]. |

ANEXO 3- ARTIGO PUBLICADO

<https://doi.org/10.1186/s13075-019-1854-6>

Arthritis Research & Therapy

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Impact of synthetic and biological immunomodulatory therapy on the duration of 17DD yellow fever vaccine-induced immunity in rheumatoid arthritis

Clarissa de Castro Ferreira^{1,5*}, Ana Carolina Campi-Azevedo^{2,5}, Vanessa Peruhype-Magalhães^{2,5}, Jordana Graziela Coelho-dos-Reis^{2,5}, Lis Ribeiro do Vale Antonelli^{2,5}, Karen Torres^{2,5}, Larissa Chaves Freire^{2,5}, Ismael Artur da Costa-Rocha^{2,5}, Ana Cristina Vanderley Oliveira¹, Maria de Lourdes de Sousa Maia³, Sheila Maria Barbosa de Lima³, Carla Magda Domingues⁴, Andréa Teixeira-Carvalho^{2,5}, Olindo Assis Martins-Filho^{2,5}, Lícia Maria Henriques da Mota¹ and on behalf of the Collaborative Group for Studies of Yellow Fever Vaccine



* Correspondence: ferreira.clarissa@gmail.com

¹Departamento de Reumatologia, Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

⁵Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-Minas, Avenida Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, Belo Horizonte 30190-002, Brazil

Background

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most prevalent chronic autoimmune diseases, and it mainly affects the peripheral joints and promotes synovitis, which may lead to cartilage damage and bone erosion [1]. The prevalence of RA ranges from 0.40 to 1.60% and 0.46 to 1.00%

in Latin America [2, 3] and Brazil [4, 5], respectively.

In recent decades, significant advances in RA clinical and therapeutic approaches have been reported worldwide, encompassing the use of conventional synthetic and biological strategies, such as pathway inhibitors/antagonists. While effective for controlling RA activity, these immunomodulatory therapies may affect pre-existing immunity to infectious diseases. In a scenario in which immunizations are effective to elicit protective immunity, it becomes relevant to understand the impact that disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARD) has on correlates of protection acquired upon vaccination [6, 7]. The ability of DMARD to modify or affect pre-existing vaccine-induced protective immunity, including the function of memory T and B cells and, as a consequence, yellow fever (YF)-specific neutralizing antibody levels, has already been reported [8]. There is a paucity of data available regarding the impact of DMARD on the duration of YF vaccine-induced immunological memory developed by RA patients.

The recent YF outbreaks in Angola (2016) and Brazil (2017/2018) [9, 10] brought about a relevant question regarding the impact that DMARD may have on RA patients previously immunized with the 17DD-YF vaccine. Assessing the duration of the immune responses triggered by YF vaccines can provide insights into elucidating the vulnerability to YF infection of RA patients under DMARD therapy.

In this context, the aim of the present study was to verify whether conventional synthetic or biological DMARD impact the cellular and humoral immunological memory of RA patients previously immunized with the 17DD-YF vaccine. These findings may be useful when making clinical decisions regarding YF vaccination in RA patients.

Methods

Subjects

Between September 17, 2014, and December 06, 2016, 136 adult patients (≥ 18 years) who met ACR classification criteria for RA were enrolled in this open-label, parallel cohort, single-center study. Patients had received a single dose of the 17DD-YF vaccine and time after vaccination estimated according to their vaccination card records; some patients have been inadvertently vaccinated before starting the DMARD therapy; all patients were residents of the metropolitan area of Brasilia, DF, Brazil, and received medical care at the University Hospital of Brasilia, University of Brasilia. Fifteen patients were excluded due to their 17DD-YF vaccination records showing < 1 year, > 30 years ($n = 12$), or missing data ($n = 3$). The final RA group comprised 121 subjects, 113 females and 9 males, aged 23 to 86 years, categorized into two subgroups based on whether they were under immunotherapy with conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs (csDMARD, $n =$

73) or under combined immunotherapy with csDMARD plus biological disease-modifying anti-rheumatic drugs (cs+bDMARD, $n = 48$). The csDMARD and cs

+bDMARD subgroups were further segregated according to the time after 17DD-YF vaccination, as follows: 1–5 years, > 5 –9 years, and ≥ 10 years. Details regarding the demographic features, clinical records, and immunomodulatory therapy dosages are provided in Table 1.

The control group of healthy subjects included 226 volunteers, 121 males and 59 females; the subjects were aged 18–82 years and categorized into five subgroups referred to as non-vaccinated subjects NV(day0) and primary vaccinated PV(day30–45) and three groups of healthy controls (CONT); the controls were categorized according to the time after their 17DD-YF vaccination: CONT(1–5 years), CONT(> 5 –9 years), and CONT(≥ 10 years). Whole blood samples were collected from each volunteer: 5 mL without anticoagulant for the plaque-reduction neutralization test (PRNT) and 20 mL in heparin to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for analyses of cellular immunity. A detailed compendium of the study population and methods are provided in Fig.1.

This study was approved by the Ethics Committee for studies with human subjects at Instituto René Rachou FIOCRUZ (CPqRR # 180911). All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

YF-neutralizing antibody test (PRNT)

The 17DD-YF-neutralizing antibody test (PRNT) was performed as previously described [11, 12]. The assays were carried out at Laboratório de Tecnologia Viroológica, Bio-Manguinhos (LATEV, FIOCRUZ-RJ, Brazil), and the results are expressed as a reverse of the samples' dilution. The samples were considered seropositive when the PRNT levels were higher than the serum dilution 1:50.

PBMC (1.0×10^6 /well) were incubated for 144 h at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, in the absence (Control/ CC) or presence of 17DD-YF antigen (17DD-YF Ag), as described previously [13]. Following the long-term incubation, the PBMC were stained with live/dead dye and a cocktail of monoclonal antibodies (mAbs), including anti-CD4/ (RPA-T4)/FITC, anti-CD8/(SK1)/PerCP-Cy5.5, anti-CD27/ (M-T271)/PE, anti-CD45RO/(UCHL1)/PE-Cy, anti-CD3/(SK7)/APC-Cy7, anti-IgD/(IA6-2)/FITC, anti-CD27/ (M-T271)/PE, and anti-CD19/(HIB19)/PerCP for the analysis of the T and B cell phenotypic memory status.

In parallel, PBMC were stained for the functional analysis of T and B cells. Cells were first incubated with anti-CD3/(UCHT1)/Qdot605, anti-CD4/(GK1.5)/APC-eFluor780, anti-CD8/(SK1)/PerCP, and anti-CD19/ (HIB19)/Alexa-Fluor700. Then, surface-stained PBMC were subjected to a fix/perm procedure and stained with anti-IFN- γ / (clone B27)/Alexa-Fluor488, anti-IL-5/ (JES1-39D10)/PE, anti-IL-10/(JES3-19F1)/APC, and anti-TNF- α /(clone MAb11)/PE-Cy7. After staining, cells were fixed, and acquisition was carried out on an LSR Fortessa Flow Cytometer.

A total of 100,000 events were acquired per sample, and gating strategies were employed for phenotypic and functional memory using the FlowJo software, version 9.3.2, as previously described [13]. Four memory T cell subsets [naïve/(NCD4 and NCD8)/CD27⁺CD45RO⁻, early effector memory/(eEfCD4 and eEfCD8)/CD27⁻CD45RO⁻, central memory/(CMCD4 and CMCD8)/CD27⁺CD45RO⁺, and effector memory/(EMCD4 and EMCD8)/CD27⁻CD45RO⁺] and three memory B cell subsets [naïve/(NCD19)/CD27⁻IgD⁺, non-classical memory/(nCMCD19)/CD27⁺IgD⁺, and classical memory/(CMCD19)/CD27⁺IgD⁻] were quantified. Cytokine⁺ cells were also quantified (TNF- α , IFN- γ , IL-10, and IL-5 for T cells and TNF- α , IL-10, and IL-5 for B cells). The results were reported as the 17DD-YF Ag/CC index, computed as the frequency of cells observed in the 17DD-YF stimulated culture (17DD-YF Ag) divided by the respective control culture (CC). The characterization of phenotypic and functional features of PBMC has been performed after 17DD-YF-specific in vitro stimuli, and the results are expressed as stimulation index, taking the results from the control culture intrinsic for the same individual as a baseline.

Multiparameter data mining strategies

Data analyses were carried out employing a set of strategies including conventional statistical, biomarker signature analysis, Venn diagram assembling, and overlaid signature curves. Conventional statistical approaches were used for comparative analysis with the reference groups NV(day0) and PV(day30–45). For this purpose, the mean value of each study group (CONT, csDMARD, and cs+bDMARD) was compared with the 95% CI of the reference groups [NV (day0) and PV (day30–45)]. The differences demonstrated by the mean values outside the 95% CI were considered significant ($p < 0.05$) and highlighted by letters “a” and “b” compared to NV (day0) or PV (day30–45). Biomarker signature analysis was carried out as described previously

[14], using the global median value of 17DD-YF Ag/CC index for each biomarker as the cut-off to define “low” or “high” 17DD-YF Ag/CC index. The biomarker signatures of NV(day0) and PV(day30–45) were overlapped as the reference curves, and those biomarkers for which more than 50% of samples were above the cut-off index were selected for further identification of biomarkers upregulated selectively by the 17DD-YF vaccine using the Venn diagram analysis (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Table 1 Demographic features, clinical records, and immunomodulatory therapy of the AR population

| Parameters | csDMARD <i>n</i> = 73 | | | cs+bDMARD <i>n</i> = 48 | | |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | 1–5 years <i>n</i> = 18 | > 5–9 years <i>n</i> = 37 | ≥ 10 years <i>n</i> = 18 | 1–5 years <i>n</i> = 10 | > 5–9 years <i>n</i> = 25 | ≥ 10 years <i>n</i> = 13 |
| Gender (F/M) | 17/01 | 35/02 | 15/03 | 09/01 | 23/02 | 13/00 |
| Age (years) | 58 (31–78) | 53 (26–86) | 49 (23–81) | 55 (28–75) | 60 (40–82) | 54 (29–80) |
| Disease duration (months) | 99 (12–432) | 114 (12–348) | 84 (12–480) | 210 (96–298) | 144 (72–370) | 168 (96–288) |
| csDMARD dose | | | | | | |
| MTX (2.5– 25 mg/week) | 17 mg (14/18) | 16 mg (35/37) | 18 mg (12/18) | 23 mg (05/10) | 17 mg (14/25) | 17 mg (04/13) |
| LEF (standard dose/day) | 20 mg (06/18) | 20 mg (19/37) | 20 mg (09/18) | 20 mg (05/10) | 20 mg (12/25) | 20 mg (06/13) |
| SSZ (1000–3000 mg/day) | 1500 mg (02/18) | – | 2300 mg (03/18) | – | 1000 mg (02/25) | 1200 mg (05/13) |
| AML (150–400 mg/day) | 275 mg (04/18) | 340mg (05/37) | – | – | 150 mg/day (01/25) | 275 mg/day (02/13) |
| AZA (2–3 mg/kg/day) | – | – | – | 150 mg (01/10) | – | – |
| CYC (3–5 mg/kg/day) | – | – | – | – | – | 200 mg (01/13) |
| ADA (standard dose/eow) | – | – | – | 40mg (01/10) | 40 mg (02/25) | 40 mg (01/13) |
| CTZ (standard dose/month) | – | – | – | 400mg (02/10) | – | 400 mg (01/13) |
| ETN (standard dose/week) | – | – | – | 50mg (05/10) | 50 mg (05/25) | 50 mg (04/13) |
| GOL (standard dose/month) | – | – | – | – | 50 mg (02/25) | 50 mg (03/13) |
| IFX (3–5 mg/kg/e8w) | – | – | – | 300mg (01/10) | 233 mg (06/25) | – |
| TCZ (8 mg/kg/month) | – | – | – | – | 496 mg (05/25) | 480 mg (02/13) |
| ABT bDMARD d | – | – | – | – | 750 mg (03/25) | 750 mg (01/13) |
| RTX (standard dose/e6m) | – | – | – | 1000mg (01/10) | 1000 mg (02/25) | 1000 mg (01/13) |
| GC | | | | | | |
| PDN(2.5–40mg/day) | 7.5mg(04/18) | 13.6mg(06/37) | 8.2mg(07/18) | 6.7mg(03/10) | 10.8mg(06/25) | 7.0 mg(05/13) |

Age is expressed as median (min-max). Disease duration in months is expressed as median (min-max). Immunomodulatory therapeutic dosages are provided for each drug and as median dose/group. csDMARD conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs, cs+bDMARD combined conventional synthetic and biological disease-modifying anti-rheumatic drugs, CG glucocorticoid, F female, M male, MTX methotrexate, LEF leflunomide, SSZ sulfasalazine, AML anti-malarial drugs (hydroxychloroquine and chloroquine phosphate), AZA azathioprine, CYC ciclosporin, ADA adalimumab, CTZ certolizumab, ETN etanercept, GOL golimumab, IFX infliximab, TCZ tocilizumab, ABT Abatacept, RTX rituximab, PDN prednisone, eow every other week, e8w every 8 weeks, e6m every 6 months

The selected set of biomarkers identified early after 17DD-YF vaccination in the PV (day30–45) group was underscored in a bold font format. These attributes were employed for comparative analyses among those biomarkers by overlaid signature curves in which the 50th percentile defined significant differences for each study group (CONT, csDMARD, and cs+bDMARD) at distinct time points after 17DD-YF vaccination.

Results

Early decrease of 17DD-YF-neutralizing antibodies is observed in RA patients undergoing combined synthetic/biological immunomodulatory therapy

The analysis of PRNT levels is presented in Fig. 2. Data are reported as ranges of PRNT levels and proportion of PRNT seropositivity (serum dilution >1:50). The results demonstrated a decrease of PRNT levels over time after 17DD-YF vaccination in all study groups (CONT, csDMARD, and cs+bDMARD) compared to the reference group PV(day30–45) (Fig. 2a). The PRNT seropositivity rate reaches critical values in CONT (71%) and csDMARD (72%) at 10 years after vaccination (Fig. 2b). Conversely, data demonstrated that combined immunotherapy has a deleterious impact on the PRNT seropositivity rate. In fact, in the cs+bDMARD group, the decrease in the PRNT seropositivity rate occurs earlier compared to CONT and sDMARD, reaching critical values (76%) at >5–9 years after 17DD-YF vaccination (Fig. 2b).

Distinct duration of 17DD-YF-specific phenotypic memory biomarkers is observed in RA patients upon immunomodulatory therapy

The profile of 17DD-specific phenotypic memory biomarkers is shown in Fig. 3. Our data show that patients with RA undergoing immunomodulatory therapy (csDMARD or cs+bDMARD) presented a distinct overall profile of phenotypic memory biomarkers, characterized by increased levels of eEfCD4 and decreased levels of CMCD4, NCD19, and nCMCD19 compared to CONT. The cs+bDMARD group presented a particular decrease of EMCD4, CMCD8, and EMCD8 as early as 1–5 years after 17DD-YF vaccination compared to CONT and csDMARD (Fig. 3).

Early decrease of 17DD-YF-specific functional memory biomarkers is observed in RA patients receiving synthetic/biological combined immunomodulatory therapy

The profile of 17DD-specific phenotypic biomarkers is shown in Fig. 4. Patients with RA undergoing immunomodulatory therapy (csDMARD or cs+bDMARD) presented a distinct pattern of functional biomarkers, particularly exemplified by decreased levels of IL-5CD8 and IL-10CD19 compared to CONT. Noteworthy was the decrease of IFNCD4, IFNCD8, TNFCD4, and TNFCD19, along with lower levels of IL-5CD4 observed in the cs+bDMARD group as early as 1–5 years after 17DD-YF vaccination compared to CONT and csDMARD (Fig. 4).

17DD-YF-specific memory biomarker signatures in RA patients undergoing immunomodulatory therapy

The biomarker signature has been proposed previously [14] as a reliable approach to characterize the overall profile of immune responses in patients vaccinated with 17DD vaccines. This approach allows the identification of the most relevant biomarkers among a range of attributes. For this purpose, we performed a comparative analysis between the biomarker signatures of the reference groups NV(day0) and PV(day30–45) to identify biomarkers selectively elicited early after vaccination (Fig. 5a). Using this multiparameter approach and Venn diagrams (Fig. 5b), we identified a set of 17DD-YF-specific biomarkers useful for further monitoring the memory signature of the study groups (CONT, csDMARD, and cs+bDMARD) over time after vaccination. A set of nine phenotypic and functional biomarkers (EMCD4, EMCD8, CMCD19, IFNCD4, TNFCD4, IL-5CD4, IFNCD8, TNFCD8, and IL-5CD8) was identified as selectively predominant in the biomarker signatures of the PV(day30–45) (Fig. 5b).

This set of biomarkers was then employed to follow up with the phenotypic/functional memory signatures among the biomarkers frequently observed above the 50th percentile over time after 17DD-YF vaccination for each study group (CONT, csDMARD, and cs+bDMARD) (Fig. 6). Among these biomarkers, special attention

was given to EMCD8 and IL-5CD4, previously reported as the top two biomarkers to monitor immunological memory to the 17DD-YF vaccine [15]. Overlaid biomarker signatures were plotted for comparative analysis among groups at distinct time points after vaccination, including 1–5 years—Fig. 6a, > 5–9 years—Fig. 6b, and ≥ 10 years—Fig. 6c. The results demonstrated that CONT and csDMARD presented a progressive decrease in the number of biomarkers above the 50th percentile, reaching a critical profile with an absence of EMCD8 at 10 years after vaccination. Conversely, the cs+bDMARD group displayed an overall shortage on the number of biomarkers above the 50th percentile, with an absence of EMCD8 as early as 1–5 years after 17DD-YF vaccination.

Venn diagrams were constructed and corroborated the finding that RA patients undergoing combined immunomodulatory therapy did not share either of the top two biomarkers (EMCD8 and IL-5CD4), considered correlates of protection elicited by the 17DD vaccination, with the PV (day30–45) reference group. The CONT and csDMARD groups presented sustained relevant levels of EMCD8 up to > 5–9 years but showed a critical decrease in this cell subset at 10 years after 17DD-YF vaccination. On the other hand, the cs+bDMARD group displayed a premature loss of the top two biomarkers as early as 1–5 years after vaccination.

Discussion

This is an innovative investigation that has been performed to evaluate the impact of immunomodulatory therapy on the duration of the YF vaccine response in RA patients who were previously given the 17DD vaccine.

In general, both immunomodulatory therapies (csDMARD or cs+bDMARD) induced an increase in eEfCD4; a decrease in CMCD4, NCD19, and nCMCD19; and diminished IL-5CD8 and IL-10CD19 compared to CONT. These cell subsets have not been nominated as the most relevant correlates of protection in adults that received the 17DD-YF vaccine [15]. Overall, less significant changes in cellular immunity were observed in RA patients undergoing therapy with csDMARD, who presented an overall similar profile to CONT. Conversely, the evidence demonstrated that therapy with cs+bDMARD has a strong impact on vaccine-induced 17DD-YF-specific memory T and B cell responses. Notably, RA patients receiving cs+bDMARD presented a decrease in PRNT levels at > 5–9 years post-vaccination and a decrease in cellular memory-related markers (EMCD4, CMCD8, EMCD8, IFNCD4, IFNCD8, TNFCD4 and TNFCD19, and IL-5CD4) as early as 1–5 years after vaccination compared to the CONT and csDMARD groups. In association with the PRNT, EMCD8 and IL-5CD4 were recently nominated as the most relevant biomarkers to

follow up with the immune response over time after the 17DD-YF vaccination [15]. The present results corroborate these two correlates of memory response upon 17DD-YF vaccination.

Neutralizing antibodies have long been known to provide protection against challenge with a wild-type virus [16]. The protective role of neutralizing antibodies induced by the YF vaccine has been estimated from dose-response studies carried out in experimental models that were challenged with a virulent YF virus after immunization [17, 18]. In this sense, the PRNT is considered the most sensitive and specific assay for the quantification of neutralizing antibodies, as well as the reference method for assessing the protective immune response after vaccination [11]. Neutralizing antibodies are induced within 30 days in approximately 98% healthy adults that received the 17D and 17DD-YF vaccines [19]. Although the neutralizing antibodies are long-lasting, a progressive decrease in the PRNT levels is observed over time after YF vaccination, with approximately 25–30% of vaccine recipients presenting seroreversion after 10 years of vaccination, suggesting the need of a booster dose to maintain the protective immunity [13, 20, 21]. Our findings corroborate these studies, as demonstrated by the evidence that both CONT and csDMARD groups presented a decrease in PRNT levels and in seropositivity rates over time, reaching critical values after 10 years post-vaccination. The earlier loss of humoral response triggered by cs+bDMARD was confirmed by the critical decrease in PRNT seropositivity rate to 76%, observed at > 5–9 years post-vaccination in the RA patients undergoing conventional synthetic plus biological im-

monotherapy schemes; this outcome contrasts with the standard decline observed in CONT and csDMARDs after 10 years of 17DD-YF vaccination. In the light of this information, the possibility of a planned booster dose upon suspension of bDMARD should be considered as a strategy to overcome the impaired levels of YF-specific memory-related responses in specific RA cases.

Several studies have reported in detail the development of the cellular immune response after YF vaccination and characterized the phenotypic and functional changes that contribute to the establishment of effector memory [13,14,22–25]. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells respond strongly to the YF vaccine [16]. It is expected that CD4⁺ T cells would act primarily to support the production of neutralizing antibody responses. CD8⁺ T cells also respond upon YF vaccination and are considered necessary to recognize and eliminate virus-infected cells. Following the initial peak of CD8⁺ T cells that occurs early after YF vaccination, the CD8⁺ T cells begin to differentiate into long-lived memory with a polyfunctional phenotype. Effector memory CD8⁺ T cells have been considered one of the top two biomarkers for monitoring the long-lasting cellular immunity triggered by the 17DD-YF vaccine [15]. In the present study, the cs+bDMARD group displayed an early loss of cellular memory to 17DD-YF vaccine, as demonstrated by reduced levels of CMCD4, CMCD8, EMCD4, and EMCD8.

When analyzing the cytokine profile, it is observed that the cs+bDMARD group presents an early and marked decrease in IFNCD4, IFNCD8, TNFCD4, TNFCD19, and IL5CD4, important markers of the immune response triggered by the YF-17DD vaccine. Increased levels of IFN- γ , TNF- α , and IL-5 have been reported previously [14, 26, 27]. Particularly, TNF has been suggested as a biomarker with a pivotal role in the 17DD-YF vaccine-induced immunity. The prominent participation of TNF produced by neutrophils, monocytes, and CD4⁺ T cells is necessary for the establishment of protective immunity following YF-17DD primary vaccination, free of adverse events [27]. In this sense, it has been demonstrated that children not responding to 17DD-YF primary vaccination presented a deficiency in the synthesis of TNF by neutrophils and monocytes [14]. Moreover, it has been shown that a decreased production of TNF, mainly by monocytes and CD4⁺ T cells, is associated with the occurrence of severe adverse events after 17DD-YF primary vaccination [28].

In a systematic review evaluating the efficacy of vaccines in patients using immunosuppressant therapy, it was noted that the use of TNF- α antagonists in combination with methotrexate was associated with a reduction of immunogenicity of influenza and pneumococcal vaccines [8,29]. Similarly, the use of RTX also led to a similar deleterious impact on the vaccine response to influenza and pneumococcal vaccines [29–32]. On the other hand, in general, AML, SSZ, and LEF did not alter the immunogenicity of these vaccines [31, 32]. These findings are consistent with those found in this study.

The strengths of the study are the simultaneous analysis of cellular and

humoral analysis of RA patients previously immunized with the 17DD-YF vaccine and currently using immunosuppressive drugs. Moreover, the csDMARDs and cs+bDMARDs groups have a considerable sample size, differing from previous investigations. The present study has some limitations, considering that it is a cross-sectional investigation that enrolled a convenient sample of RA patients, several of them with previous therapeutic schemes, making it difficult to analyze the impact of each class of DMARD. Furthermore, as this is a cross-sectional study, it does not allow the analysis of the temporal dynamics of the immune response induced by the 17DD-YF vaccine in each individual.

Together, our findings showed that RA patients undergoing treatment with cs+bDMARD have a shorter duration of 17DD-YF vaccine-induced immunity. Based on these results, we suggest that a planned booster dose should be provided to RA patients, especially those residents or travelers to YF-endemic regions. The Brazilian Societies of Rheumatology, Tropical Medicine and Immunization have issued a technical note recommending YF vaccination for patients with immune-mediated rheumatic diseases who are at risk of YF, including those undergoing low immunosuppression or even those under cs+bDMARD therapy for whom the discontinuation of medication is allowed. [33] This vaccination strategy would boost

YF-17DD immune responses and ensure safe vaccination, allowing the subsequent return of immunomodulatory therapy after safe immunization.

Conclusions

csDMARD therapy did not affect the duration of protective immunity induced by the 17DD-YF vaccine compared to that of CONT, as both presented a significant time-dependent decline at 10 years after vaccination. Conversely, cs+bDMARD therapy induced a premature depletion in the main determinants of the vaccine protective response, with diminished PRNT seropositivity levels between 5 and 9 years and impaired effector memory in CD8+ T cells as early as 1–5 years after 17DD-YF vaccination.

These findings could support changing the vaccination schedule of this population, with the possibility of a planned booster dose upon the suspension of bDMARD in cases where this is allowed, even 10 years following 17DD-YF vaccination. The benefit of a planned booster dose should be evaluated in further studies.

Abbreviations

e6m: Every 6 months; e8w: Every 8 weeks; eow: Every other week; ABT: Abatacept; ACR: American College of Rheumatology; ADA: Adalimumab; AML: Anti-malarial; AZA: Azathioprine; CC: Control culture; CM: Central memory; CONT: Control group; cs+bDMARD: Conventional synthetic plus biological DMARD; csDMARD: Conventional synthetic DMARD; CTZ: Certolizumab; CYC: Cyclosporin; DMARD: Disease-modifying anti-rheumatic drugs; eEf: Early effector memory; EM: Effector memory; ETN: Etanercept; GOL: Golimumab; IFX: Infliximab; LEF: Leflunomide; mAbs: Monoclonal antibodies; MTX: Methotrexate; N: Naïve; nCM: Non-classical memory; NV: Non-vaccinated; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; PDN: Prednisone; PRNT: Plaque-reduction neutralization test; PV: Primary vaccinated; RA: Rheumatoid arthritis; RTX: Rituximab; SSZ: Sulfasalazine;

TCZ: Tocilizumab; TNF: Tumor necrosis factor; YF: Yellow fever

References

1. Araki Y, Mimura T. The mechanisms underlying chronic inflammation in

- rheumatoid arthritis from the perspective of the epigenetic landscape. *J Immunol Res*. 2016;6290682. <https://doi.org/10.1155/2016/6290682>.
2. Spindler A, Bellomio V, Berman A, Lucero E, Baigorria M, Paz S, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in Tucuman. *Argentina J Rheumatol*. 2002; 29:1166–70.
 3. Pelaez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M, et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol Suppl*. 2011; 86:3–8.
 4. Marques-Neto JF, Gonçalves ET, Langen LFOB, Cunha MFL, Radominski S, Oliveira SM, et al. Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in Brazilian population samples. *Rev Bras Reumatol*. 1993; 33:169–73.
 5. Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa F, Pereira LV, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*. 2004; 31:594–7.
 6. Meroni PL, Zavaglia D, Girmenia C. Vaccinations in adults with rheumatoid arthritis in an era of new disease-modifying antirheumatic drugs. *Clin Exp Rheumatol*. 2017; 36:317–28.
 7. Muniz LF, Silva CR, Costa TF, da Mota LM. Vaccination in patients from Brasilia cohort with early rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol*. 2014; 54: 349–55.
 8. Friedman MA, Winthrop KL. Vaccines and disease-modifying antirheumatic drugs: practical implications for the rheumatologist. *Rheum Dis Clin N Am*. 2017; 43:1–13.
 9. Goldani LZ. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. *Braz J Infect Dis*. 2017; 21: 123–4.
 10. Ortiz-Martinez Y, Patino-Barbosa AM, Rodriguez-Morales AJ. Yellow fever in the Americas: the growing concern about new epidemics. *F1000Res*. 2017; 6: 398.
 11. Simoes M, Camacho LA, Yamamura AM, Miranda EH, Cajaraville AC, Silva-Freire M. Evaluation of accuracy and reliability of the plaque reduction neutralization test (micro-PRNT) in detection of yellow fever virus antibodies. *Biologicals*. 2012; 40:399–404.
 12. Miyaji KT, Avelino-Silva VI, Simoes M, Freire MD, Medeiros CR, Braga PE, et al. Prevalence and titers of yellow fever virus neutralizing antibodies in previously vaccinated adults. *Rev Inst Med Trop SP Paulo*. 2017; 59:e2 <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201759002>.
 13. Campi-Azevedo AC, Costa-Pereira C, Antonelli LR, Fonseca CT, Teixeira-Carvalho A, Villela-Rezende G, et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12:491–502.
 14. Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Avelar RS, Silveira-Lemos D, et al. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *J Infect Dis*. 2011; 204:873–83.
 15. Costa-Pereira C, Campi-Azevedo AC, Coelho-dos-Reis JG, Peruhype-Magalhães V, Araújo MSS, Antonelli LR, et al. Multi-parameter approach to evaluate the timing of memory status after primary 17DD-YF vaccination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006462>.
 16. Watson AM, Klimstra WB. T cell-mediated immunity towards yellow fever virus and useful animal models. *Viruses*. 2017; 9. <https://doi.org/10.3390/v9040077>.
 17. Mason RA, Tauraso NM, Spertzel RO, Ginn RK. Yellow fever vaccine: direct challenge of monkeys given graded doses of 17D vaccine. *Appl Microbiol*. 1973; 25:539–44.
- Julander JG, Trent DW, Monath TP. Immune correlates of protection against yellow fever determined by passive immunization and challenge in the hamster model. *Vaccine*. 2011; 29:6008–16

