Mariana Prado Marmorato

**Caracterização da expansão de plasmoblastos e dos anticorpos deles
derivados após a vacinação com 17DD e infecção natural pelo vírus da
febre amarela selvagem**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

Coorientadora: Profa. Dra. Cássia Gisele Terrassani Silveira

São Paulo

2019

Mariana Prado Marmorato

**Caracterização da expansão de plasmoblastos e dos anticorpos deles
derivados após a vacinação com 17DD e infecção natural pelo vírus da
febre amarela selvagem**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

Coorientadora: Profa. Dra. Cássia Gisele Terrassani Silveira

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Marmorato, Mariana Prado

Caracterização da expansão de plasmoblastos e dos anticorpos deles derivados após a vacinação com 17DD e infecção natural pelo vírus da febre amarela selvagem / Mariana Prado Marmorato. -- São Paulo, 2019.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Immunopatologia.

Orientador: Esper Georges Kallás.

Coorientadora: Cássia Gisele Terrassani Silveira.

Descritores: 1.Febre amarela 2.Vacina contra a febre amarela 3.Linfócitos B 4.Imunidade humoral 5.Região variável de imunoglobulina 6.Anticorpos monoclonais

USP/FM/DBD-358/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico essa dissertação aos meus pais pelo incentivo e apoio incondicional em todas as minhas escolhas e por sempre estarem ao meu lado e acreditar no meu potencial. Sem vocês minhas conquistas não teriam o menor significado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Esper Georges Kallás, por toda a orientação e os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Cássia G. Terrassani Silveira, pela orientação, por todos os ensinamentos passados, ajudas (mesmo que à distância), palavras de conforto, risadas e choros e por toda amizade. Você foi essencial para que este trabalho fosse realizado da melhor maneira possível.

A todos do Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM-60):

Cândida Dantas, Issler Moraes e Renan Carvalho, por todo apoio em quesitos burocráticos, financeiros e ajudas em momentos de urgência.

Helena Tomiyama, Claudia Tomiyama, Maria Angélica Neves, Aline Lumertz, Lucas Souza, Carlos Palma e Ruth Bonadia por todo material solicitado, empréstimos temporários de equipamentos e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Ederson Xavier por toda solicitação de material respondida, todos os momentos de descontração e todos os chocolates e risadas proporcionados.

Juliana Dias por todos os dias que viraram noite e todos os experimentos em que você poderia ter ido para casa e ficou me incentivando, me ajudando e por vezes corrigindo e melhorando o jeito de fazer tudo, sou muito agradecida pela sua amizade e por todas as risadas e desabafos proporcionados ao longo desses anos.

Priscilla Costa por me acompanhar desde o começo, passando todos os seus maravilhosos ensinamentos em citometria e por não sair do meu lado quando chegaram os dias de muitos experimentos e os temidos *Single Cel Sorting*, por render muitas risadas com seu jeito único e pelos seus “florzinha” que fizeram dos meus dias mais leves.

Carolina Argondizo, Mateus Tomazella, Andrea Niquirilo, Ana Carolina Soares, Luiz Zanella e Camila Donini por todas as ajudas, desde experimentos até discussões científicas e as não científicas também (incluindo as muitas risadas e momentos de pura gula). A companhia de vocês deixou meus dias muito mais felizes.

Eleni Arruda por toda tranquilidade, por me acalmar em diversos momentos de desespero por conta de prazos e pela ajuda em todos os processos burocráticos.

A todos responsáveis pelas coletas das amostras utilizadas neste projeto: médicos, enfermeiros e técnicos de enfermagem.

Ao professor David Watkins por ter me recebido tão bem como parte do projeto e pelos novos conhecimentos proporcionados.

A Nuria Lopez, Mike Ricciardi, Varian Bailey e Diogo Magnani pelos dias de experimentos, ensinamentos e sobretudo, pela paciência.

A todos os membros da banca, titulares e suplentes, que aceitaram tão prontamente o convite.

A Clarissa Bittencourt e Nathália Khaled pela amizade, companheirismo, pelos momentos de distração, gula, pelas risadas e desabafos, por todo incentivo e por acreditarem no meu potencial. Obrigada por nunca terem desistido de mim.

Aos pacientes e às famílias. Cada TCLE assinado, cada amostra coletada, cada descoberta alcançada só foi possível porque vocês nos deram seu voto de confiança.

À CAPES e FAPESP pelo incentivo a pesquisa e financiamento. Esse trabalho foi financiado em parte pelo projeto de mestrado FAPESP 2017/08953-3.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	FEBRE AMARELA.....	1
1.1.1	O Vírus e a Patogênese.....	1
1.1.2	Epidemiologia.....	2
1.1.3	Prevenção.....	5
1.1.4	Imunopatologia.....	7
1.1.5	Imunidade humoral, anticorpos neutralizantes.....	8
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	MÉTODOS.....	19
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	20
3.2	SUJEITOS DE PESQUISA E PLANO DE COLETA DE AMOSTRAS.....	20
3.3	CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPANSÃO DE PLASMOBLASTOS POR IMUNOFENOTIPAGEM DE SUPERFÍCIE.....	25
3.4	ISOLAMENTO DE PLASMOBLASTOS INDIVIDUAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	26
3.5	AMPLIFICAÇÃO DE IG DE CÉLULA ÚNICA.....	27
3.6	SEQUENCIAMENTO DOS SEGMENTOS V _H E V _L	29
3.7	PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DAS REGIÕES V _H E V _L DE GEL DE AGAROSE.....	30
3.8	CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA.....	31
3.8.1	Ligação Inseto-Plasmídeo.....	31
3.8.2	Transformação Bacteriana.....	32
3.8.3	PCR de Colônia.....	32

3.8.4	Purificação do DNA Plasmidial Contendo o Inseto de Interesse.....	33
3.9	TRANSFEÇÃO DOS VETORES CONTENDO O INSERTO DE INTERESSE	34
3.10	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS rhlgGs	35
3.11	ENSAIOS DE LIGAÇÃO DAS rhlgGs A YFV-17D.....	36
3.12	TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE FOCOS.....	36
3.13	ANÁLISE DOS DADOS.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	CINÉTICA DE EXPANSÃO DE PLASMOBLASTOS CIRCULANTES.....	41
4.1.1	Indivíduos Vacinados.....	41
4.1.2	Indivíduos com Infecção Natural.....	43
4.2	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES VH E VL DA IGS DERIVADAS DE PLASMOBLASTOS INDIVIDUAIS.....	56
4.3	SEQUENCIAMENTO.....	60
4.4	QUANTIFICAÇÃO DE IGG TOTAL.....	67
4.5	ENSAIO DE LIGAÇÃO AO VÍRUS VACINAL YFV-17D.....	70
4.6	ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	73
5	CONCLUSÕES.....	78
6	ANEXOS.....	79
7	APÊNDICES.....	81
8	REFERÊNCIAS.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	- Porcentagem
°C	- grau Celsius
µl	- microlitro
µM	- micromolar
aa	- Aminoácido
Abs	- <i>Antibodies</i>
ACD	- Ácido dextrose
AIDS	- <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
BSA	- <i>Bovine Serum Albumin</i>
CD	- <i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	- <i>complementary DNA</i>
CDR3	- <i>Complementary Determining Region 3</i>
CMSP	- Células Mononucleares do Sangue Periférico
DENV	- <i>Dengue Virus</i>
DNA	- <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	- <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EDTA	- <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FSC-A	- <i>Forward Scatter- area</i>
FSC-H	- <i>Forward Scatter- height</i>
FUNASA	- Fundação Nacional de Saúde
g	- Força g
HIV	- <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IgG	- Imunoglobulina do tipo G
IgM	- Imunoglobulina do tipo M
kb	- kilobase
M	- molar
mAb	- <i>Monoclonal Antibody</i>
mg	- miligrama
mM	- milimolar
ng	- nanograma
NS	- <i>Non structural</i>
NTR	- <i>Non Translated Region</i>
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	- <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFA	- Paraformaldeído
pH	- Potencial Hidrogênico
pmol	- picomolar
RNA	- <i>Ribonucleic Acid</i>
SHM	- <i>Somatic Hypermutation</i>
SSC-A	- <i>Side Scatter- area</i>
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

U	- <i>Units</i>
YFV	- <i>Yellow Fever Virus</i>
ZIKV	- <i>Zika Virus</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Organização do genoma do YFV. Representação esquemática do RNA viral e da poliproteína por ele codificada.....	1
Figura 2 -	Número de casos confirmados para febre amarela e dados de letalidade entre os anos de 1980 e junho de 2018, atualizado em setembro de 2018.....	4
Figura 3 -	Representação esquemática da estrutura de um anticorpo IgG demonstrando as regiões constantes e variáveis das cadeias pesada (IgH) e leve (IgL).....	12
Figura 4 -	Desenho experimental.....	19
Figura 5 -	Protocolo de coleta de amostras de sangue periférico.....	21
Figura 6 -	Procedimentos para caracterização de Abs derivados de plasmoblastos circulantes isolados.....	28
Figura 7 -	Estratégia de análise da frequência de plasmoblastos circulantes.....	39
Figura 8 -	Cinética de expansão de plasmoblastos circulantes em voluntários vacinados com a formulação 17DD (n = 7).....	42
Figura 9 -	Cinética de expansão de plasmoblastos circulantes nos indivíduos com infecção natural pelo YFV (n=70).....	45
Figura 10 -	Cinética de expansão de plasmoblastos circulantes nos indivíduos infectados naturalmente pelo YFV categorizados por histórico de vacinação.....	52
Figura 11 -	Visualização dos fragmentos amplificados (400-450 kb) das regiões variáveis da cadeia pesada de Ig após eletroforese em gel de agarose 2%.....	58
Figura 12 -	Análise de frequência das famílias de IgHV da região variável da cadeia pesada das Igs derivadas de voluntários vacinados com a formulação 17DD e de indivíduos infectados pelo YFV.....	63
Figura 13 -	Análise de frequência das famílias de IgKV das sequências da região variável da cadeia leve do tipo kappa das Igs derivadas de voluntários vacinados com a formulação 17DD e de indivíduos infectados pelo YFV.....	66
Figura 14 -	Análise de frequência das famílias de IgLV das sequências da região variável da cadeia leve do tipo lambda das Igs derivadas de voluntários vacinados com a formulação 17DD e de indivíduos infectados pelo YFV.....	67
Figura 15 -	Concentração de IgG total das imunoglobulinas recombinantes (rIgG).....	68

Figura 16 -	ELISA qualitativo de ligação das imunoglobulinas recombinantes à cepa vacinal YFV-17D.....	71
Figura 17 -	Porcentagem de neutralização das imunoglobulinas em sua concentração do sobrenadante puro contra a cepa YFV-17D.....	74
Figura 18 -	Capacidade de neutralização das imunoglobulinas contra a cepa YFV-17D após diluição seriada (1:5, 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280, 1:5120 e 1:20480).....	77

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 -	Informações sobre os voluntários saudáveis vacinados com a formulação 17DD (n=7).....	22
Tabela 2 -	Informações sobre os indivíduos com infecção natural pelo YFV selvagem após início de sintomas (n=70).....	23
Tabela 3 -	Painel de anticorpos específicos de marcadores de superfície utilizado para identificação da população de plasmoblastos.....	26
Tabela 4 -	Sequência e conjunto de primers utilizados para a amplificação das regiões variáveis da cadeia pesada e leve (kappa e lambda) das imunoglobulinas de células únicas isoladas.....	29
Tabela 5 -	Características dos vetores utilizados para a transformação bacteriana.....	32
Tabela 6 -	Frequência (%) de plasmoblastos (CD19 ⁺ CD3 ⁻ CD14 ⁻ CD20 ^{-low} CD27 ^{high} CD38 ^{high}) em voluntários vacinados com a formulação 17DD (n=7) nos dias B, D7, D14 e D28, pré e pós-vacinação.....	43
Tabela 7 -	Análise estatística (teste não paramétrico de Mann-Whitney) da frequência (%) de plasmoblastos detectada no grupo de voluntários vacinados com 17DD (n=7), pré e pós-vacinação.....	43
Tabela 8 -	Frequência (%) de plasmoblastos (CD19 ⁺ CD3 ⁻ CD14 ⁻ CD20 ^{-low} CD27 ^{high} CD38 ^{high}) nos indivíduos sobreviventes com infecção natural pelo YFV (n=44) nos dias 4, 6, 10, 12, 14 e 30 após início de sintomas.....	45
Tabela 9 -	Frequência (%) de plasmoblastos (CD19 ⁺ CD3 ⁻ CD14 ⁻ CD20 ^{-low} CD27 ^{high} CD38 ^{high}) nos indivíduos com infecção natural pelo YFV que foram a óbito (n=26) nos dias 4, 6, 10, 12, 14 e 30 após início de sintomas.....	47
Tabela 10 -	Análise estatística (teste não paramétrico de Mann-Whitney) realizada para os indivíduos com infecção natural pelo YFV separados em subgrupos conforme desfecho (sobreviventes e óbitos).....	48
Tabela 11 -	Análise estatística (teste não paramétrico de Mann-Whitney) realizada para os indivíduos com infecção natural pelo YFV que afirmaram não terem vacina prévia contra febre amarela (17DD) e categorizados em grupos conforme desfecho clínico: sobreviventes e óbitos.....	52
Tabela 12 -	Análise estatística (teste não paramétrico de Mann-Whitney) realizada para os indivíduos com infecção natural pelo YFV que afirmaram terem vacina prévia contra febre amarela (17DD) e categorizados em grupos conforme desfecho clínico: sobreviventes e óbitos.....	54

Tabela 13 -	Resumo dos procedimentos de amplificação de Ig de célula única realizados em placas de 96 poços contendo plasmoblastos únicos obtidos de seis voluntários vacinados com a formulação 17DD.....	59
Tabela 14 -	Resumo dos procedimentos de amplificação de Ig de célula única realizada em amostras de placas de 96 poços contendo plasmoblastos únicos obtidas de cinco indivíduos infectados com o YFV selvagem.....	59
Tabela 15 -	Resumo da caracterização dos fragmentos das regiões variáveis obtidas no isolamento de plasmoblastos individuais derivados de voluntários vacinados com a formulação 17DD e indivíduos com infecção natural pelo YFV.....	61
Tabela 16 -	Concentração (ug/mL) total de imunoglobulinas do tipo IgG contendo as sequências dos pares IgVH/IgVL derivados de indivíduos com infecção natural pelo YFV.....	68
Tabela 17 -	Valores da média de três medições de absorbância a 450 nm das imunoglobulinas referentes aos pares de sequências clonadas dos indivíduos com infecção natural pelo YFV.....	72
Tabela 18 -	Porcentagem de neutralização das imunoglobulinas em sua concentração do sobrenadante puro contra a cepa YFV-17D. Os valores obtidos correspondem à média de três contagens de focos de infecção.....	74

RESUMO

Marmorato MP. *Caracterização da expansão de plasmoblastos e dos anticorpos deles derivados após a vacinação com 17DD e infecção natural pelo vírus da febre amarela selvagem* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A febre amarela (FA) é uma arbovirose que ainda representa um problema de saúde pública no Brasil, onde se notificou um surto recente com 1376 casos confirmados e taxa de letalidade de 35%. A vacina antiamarílica é altamente eficaz, conferindo imunidade protetora contra o vírus da febre amarela (YFV), provavelmente pela indução de anticorpos (Abs) neutralizantes. Apesar da eficácia da vacina estar bem estabelecida, a cobertura vacinal ainda é deficiente e não existe um tratamento específico para FA. Desta forma, o uso de Abs neutralizantes na prevenção e no tratamento pode representar uma estratégia promissora de enfrentamento da doença. O objetivo deste projeto foi caracterizar a cinética de expansão da população de plasmoblastos (PBs) circulantes e o repertório de Abs monoclonais deles derivados presentes no sangue periférico de pacientes com febre amarela (n=70) ou que receberam a vacina 17DD (n=7), bem como a capacidade de ligação e neutralização do YFV. A análise de citometria de fluxo multiparamétrica revelou que a frequência de PBs (CD27^{high} CD38^{high}) não aumentou de forma significativa após a vacinação, ao contrário do que ocorreu no grupo de pacientes infectados pelo YFV, em que foi observada uma grande expansão de PBs (p<0,001), atingindo o pico de expansão no 6º dia após o início dos sintomas. Os PBs circulantes derivados dos dois grupos de doadores foram isolados e submetidos às reações de amplificação e sequenciamento das regiões variáveis das cadeias leve e pesada das Imunoglobulinas (Ig). Foram amplificados 668 pares de Ig de ambos os grupos com uma alta taxa de identidade com sequências germinativas e alto nível de hipermutação somática. Os genes da família IgHV3 foram frequentemente detectados nas Ig isoladas nos dois grupos estudados, seguidos por IgHV4 em infectados e IgHV1 em vacinados. Os Abs derivados do grupo de infectados foram clonados em plasmídeos e expressos para avaliação de suas afinidades e capacidades de neutralização da cepa YFV-17D. A afinidade de ligação dos Abs foi modesta e nenhum deles foi capaz de neutralizar a cepa 17D *in vitro*. Nossos dados sugerem que a infecção por YFV induz uma expansão acentuada de PBs que expressam Abs de baixa afinidade e capacidade neutralizante durante a fase aguda da doença.

Descritores: Febre amarela; Vacina contra a febre amarela; Linfócitos B; Imunidade humoral; Região variável de imunoglobulina; Anticorpos monoclonais.

ABSTRACT

Marmorato MP. *Characterization of plasmablasts expansion and antibodies derived therefrom after 17DD vaccination and natural infection with wild-type yellow fever virus*. [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Yellow fever (YF) is an arboviral disease that remains a public health problem in Brazil, where a recent outbreak occurred with 1376 confirmed cases 35% of lethality rate. The yellow fever vaccine is highly effective conferring protective immunity against yellow fever virus (YFV) probably by induction of neutralizing antibodies (Abs). Despite the effectiveness of the well-established vaccine, vaccination coverage is poor and there is no specific treatment for YF yet, which has a high mortality rate. Faced with the constant challenges in the fight against YFV and considering the relevance of neutralizing Abs in prevention, the therapeutic use of these molecules may represent a promising strategy. Thus, the aim of this project is to characterize kinetics expansion of circulating plasmablasts (PBs) and the PBs-derived repertoire of monoclonal Abs present in the peripheral blood of patients with yellow fever (n=70) or vaccinated with 17DD (n=7), as well as the YFV binding and neutralization capability. The multiparametric flow cytometric analysis revealed the frequency of PBs (CD27^{high} CD38^{high}) did not show a significant increase in the vaccinated group; in contrast in YFV infected patients the magnitude of PBs response was significantly high (P<0.001), reaching peaking number on the 6th day after the onset of symptoms. Circulating PBs derived from the two groups were isolated and subjected to amplification and sequencing reactions of the variable regions of heavy and light chains from the immunoglobulin (Ig). A total of 668 Ig pairs from both groups were obtained and they presented a high identity rate with germline sequences and elevated level of somatic hypermutation. The IgHV3 family was frequently seen among the isolated Ig from both groups followed by IgHV4 in infected individuals and IgHV1 in vaccinees. Abs were isolated from the infected group after cloning and transfection, though the binding affinity was modest and none of them were able to neutralize the 17D strain *in vitro*. Our data suggest that YFV infection stimulates a significant PBs expansion of low affinity and poor neutralizing capability Abs during the acute phase of the disease.

Descriptors: Yellow fever; Yellow fever vaccine; B lymphocytes; Immunity, humoral; Immunoglobulin variable region; Antibodies, monoclonal.

1 INTRODUÇÃO

1.1 FEBRE AMARELA

1.1.1 O Vírus e a Patogênese

A febre amarela é uma doença infecciosa, com ocorrência em áreas tropicais e subtropicais da América do Sul e África, causada por um arbovírus pertencente a família *Flaviridae* do gênero *Flavivirus* (MONATH; VASCONCELOS, 2015). O vírus da febre amarela (YFV, do inglês, *Yellow Fever Virus*) foi um dos primeiros vírus descobertos, e apresenta apenas um sorotipo, com variações genéticas identificadas na América e África (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Tais variações não parecem mudar a gravidade da doença. O YFV possui um genoma de RNA de fita positiva de 11 kb que codifica uma poli proteína composta por três proteínas estruturais [capsídeo (C), precursor de membrana (prM) e envelope (E)] e sete proteínas não estruturais (NS, do inglês, *non-structural proteins*) (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (LINDENBACH; RICE, 2003). As proteínas estruturais integram os vírions e as proteínas não estruturais são produzidas apenas dentro de células infectadas, pois coordenam a replicação do RNA e a montagem viral (LINDENBACH; RICE, 2003) (Figura 1).

Figura 1. Organização do genoma do YFV. Representação esquemática do RNA viral e da poliproteína por ele codificada

FONTE: Adaptado de DOUAM e PLOSS, 2018.

NOTA: No esquema da poliproteína, as setas indicam os sítios de clivagem em que agem proteases de origem celular e viral durante o processamento pós-transcricional.

A transmissão do YFV ocorre por meio da picada de mosquitos da família *Culicidae*, principalmente dos gêneros *Aedes* ou *Haemagogus*, causando as denominadas febre amarela urbana e febre amarela silvestre, respectivamente. No Brasil o vírus pode ser igualmente transmitido através da picada do mosquito *Sabethes*, também da família *Culicidae*, causando a febre amarela silvestre (VASCONCELOS et al., 2004). Apesar de receberem nomes distintos, a doença é causada pelo mesmo vírus e ao contrário de outras infecções causadas por vírus transmitidos por mosquitos, os humanos infectados não são hospedeiros finais e são capazes de infectar os mosquitos durante os períodos de viremia, em que o nível de vírus circulante no sangue é alto (VASCONCELOS, 2003).

A patogênese da febre amarela inicia-se após a inoculação do YFV através do mosquito infectado. O vírus primeiramente se reproduz nos linfonodos localizados próximos ao local de entrada e se dissemina para outros órgãos, principalmente o fígado, levando a lesões teciduais que também são decorrentes da resposta imune do hospedeiro contra a infecção (MONATH, 1991; QUARESMA et al., 2006a; QUARESMA et al., 2006b). A partir da disseminação do YFV para outros órgãos, nota-se a presença da viremia em sangue periférico, que pode ser constatada durante as primeiras horas de infecção, com duração de aproximadamente 48h (VASCONCELOS, 2003). As manifestações clínicas são variadas podendo apresentar-se com sintomatologia moderada (o que acontece em aproximadamente 80% dos casos), ou evoluir para uma doença grave caracterizada por febre hemorrágica acompanhada de acometimento hepático e renal progressivo (VASCONCELOS, 2003).

1.1.2 Epidemiologia

A primeira epidemia relatada de febre amarela ocorreu em 1648, no México (VASCONCELOS, 2003; ROGERS et al., 2006; HIGGS, 2016). Desde então, o vírus se manteve endêmico na região de florestas tropicais da América

do Sul e também da África, causando epidemias de pequeno e grande impacto. Em associação às variações climáticas, o movimento de grandes populações (principalmente relacionado ao aumento global de viajantes para locais exóticos e de alto risco médico) têm ampliado o risco de epidemias para áreas não endêmicas (CLETON et al., 2012).

Entre os anos de 2015 e 2016 uma grande epidemia de febre amarela ocorreu na África, mais precisamente na região da Angola e República Democrática do Congo, onde foram notificados mais de 7.334 casos suspeitos, sendo 962 casos confirmados dos quais 393 evoluíram para óbito em decorrência da doença (WHO, 2016b; KRAEMER et al., 2016). Novamente, em 2017, ocorreu um surto de febre amarela na Nigéria, envolvendo 341 casos suspeitos, sendo a taxa de letalidade para os casos confirmados de 28,1% (WHO, 2017a). Atualmente, 47 países da África e da América Central e do Sul têm regiões onde existe risco de febre amarela, com cerca de 200.000 casos graves por ano em todo o mundo e uma taxa de letalidade que pode chegar a 30% (CHEN et al, 2018).

No Brasil, após os últimos casos de febre amarela urbana notificados em 1942, no Acre, outros casos foram observados na década de 70, em áreas de risco indene, coincidindo com a reintrodução do mosquito *Aedes aegypti* em regiões urbanas. Com relação à febre amarela silvestre, entre os anos de 2000 e 2010, no Brasil, foram confirmados 324 casos, dos quais cerca de 50% evoluíram para óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Posteriormente, em 2015, casos da febre amarela silvestre também foram observados no Mato Grosso do Sul, Goiás e Pará (WHO, 2016a; PAHO; WHO, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Entre 2016 e 2017 novos surtos de febre amarela silvestre foram confirmados na região sudeste do país. De fato, foi constatado que, em 2016, o YFV voltou a circular na região norte e nordeste do estado de São Paulo após a confirmação de 16 fatalidades de primatas não humanos pelo YFV e um caso da doença em humanos (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016). No ano seguinte, foram reportados diversos casos e óbitos confirmados de febre amarela, ocorrendo, principalmente, no estado de Minas Gerais, que chegou a decretar estado de emergência em Janeiro de 2017 (DIÁRIO DO EXECUTIVO, 2017).

Uma atualização do monitoramento dos casos de febre amarela no Brasil realizado entre julho de 2017 e maio de 2018, e divulgado em outubro de 2018, relatou que foram notificados 7518 casos em todo o país, sendo desses 1376 confirmados dos quais 35,1% evoluíram para óbito. Além deles, foram confirmados 864 casos em primatas não-humanos no mesmo período. Esse foi considerado o maior surto de febre amarela no Brasil na série histórica desde 1980 (Figura 2). A maioria dos casos notificados foram provenientes da região sudeste do país, principalmente dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

Figura 2. Número de casos confirmados para febre amarela e dados de letalidade entre os anos de 1980 e junho de 2018, atualizado em setembro de 2018

FONTE: Sinan; GT-Arbo/CGDT/DEVIT/SVS/MS; COES-FA.

O estado de São Paulo foi o que mais notificou casos de febre amarela entre 2017 e 2018. Somente no ano de 2017, 103 casos de febre amarela foram confirmados com uma taxa de letalidade de 45,6% (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2018). Entre janeiro e dezembro de 2018, foram notificados 3315 casos suspeitos da doença, sendo 538 confirmados com 34,2% evoluindo para óbito. Dos casos confirmados, 80,8% eram do sexo

masculino e a mediana de idade era de 43 anos (com intervalo de 5 até 90 anos). A maioria dos casos (n=499) incluiu indivíduos residentes do estado, sendo os maiores sítios de infecção as cidades de Mairiporã (152 casos), Atibaia (48 casos) e Nazaré Paulista (29 casos), localizadas no interior do estado de São Paulo (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2018a).

1.1.3 Prevenção

De acordo com a Funasa (Fundação Nacional de Saúde), os gastos federais no combate de arboviroses, incluindo a febre amarela, ultrapassaram trezentos bilhões de reais entre os anos de 1996 e 2000, nos cinco principais estados do país: Bahia, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2010). Esses gastos foram empregados para o combate do principal vetor transmissor dessas doenças, o mosquito *Aedes aegypti*, como também para distribuição da vacina contra febre amarela.

Vacinas altamente eficazes já estão disponíveis para vários flavivírus, incluindo aquelas para prevenção da encefalite transmitida por carrapatos (HEINZ et al., 2007), da encefalite japonesa (HALSTEAD e THOMAS, 2010) e da febre amarela (BARRETT e TEUWEN, 2009). Contudo, a cobertura vacinal ainda não é totalmente eficaz e nenhuma droga antiviral para quaisquer dessas arboviroses está atualmente aprovada para uso clínico. Somam-se a esses fatores a complexidade do diagnóstico de febre amarela, especialmente durante a fase inicial da doença, quando os sintomas podem ser confundidos com outras infecções como malária, leptospirose, hepatites virais (principalmente com as formas fulminantes da hepatite B e D) e por outros flavivírus, incluindo dengue (DENV) e zika (ZIKV) (VERMA et al., 2014). Não havendo tratamento específico para febre amarela, a vacinação é considerada a principal estratégia de controle e prevenção da doença.

A vacina antiamarílica foi a primeira vacina de vírus vivo atenuado a ser utilizada em humanos (revisado em FRIERSON, 2010). A vacina foi produzida, em 1937, a partir da cepa africana Asibi que foi submetida a múltiplas passagens (quando um cultivo primário é subcultivado e assim por diante) em culturas de células e em infecções experimentais em animais. Atualmente as vacinas disponíveis são provenientes da cepa atenuada 17D, sendo elas:

17DD (fabricada apenas no Brasil, com 195 passagens), 17D-213 (Rússia) e 17D-204 (China, França, Senegal e Estados Unidos) (BARRETT, 2016; CHEN; HAMER, 2017; VASCONCELOS, 2003). As vacinas confeccionadas no Brasil, França, Rússia e Senegal foram avaliadas para padrões de qualidade, segurança e eficácia e podem ser distribuídas internacionalmente de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (BARRETT, 2016; WHO, 2013). As cepas 17DD e 17D-204 tem 99,9% de homologia em suas sequências, diferindo em 20 aminoácidos para a cepa Asibi, sendo essa a diferença que impossibilita a transmissão através de mosquitos (WHO, 2013).

As vacinas contra febre amarela se mostraram extremamente eficazes e capazes de gerar imunidade protetora com apenas uma dose, conforme demonstrado em estudos recentes (BARRETT e TEUWEN, 2009; FERREIRA et al., 2011; HIGGS, 2016). Por esta razão, a OMS recomenda a imunização com uma dose única da vacina para todas as crianças a partir de nove meses e adultos que vivam em áreas endêmicas para o YFV, ou que pretendem se dirigir a elas (VASCONCELOS, 2003; WHO, 2013). Entretanto, as formulações vacinais são contraindicadas para pessoas com quadro de imunodeficiência, incluindo indivíduos HIV+ com $CD4^+$ abaixo de $200/mm^3$, que tenham câncer ou em uso de medicação imunossupressora, embora seja possível vacinação após avaliação seguida de autorização médica (MONATH, 2001).

No Brasil, o Ministério da Saúde expandiu a cobertura da vacinação 17DD em 2014. Atualmente a recomendação é de uma dose padrão (0,5 ml) para crianças entre nove meses e dois anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b). É também recomendado dose fracionada da vacina (0,1 ml) para viajantes e residentes em áreas endêmicas. A vacina 17DD tem efeito contra todos os sete genótipos do YFV, que são circulantes na América do Sul e na África. Os genótipos distintos do YFV diferem de 7,9 a 25,1% na expressão de proteínas, porém não causam sintomas ou apresentação diferente da doença (SANTOS-TORRES et al., 2000; BARRET, 2010).

Devido aos grandes surtos da doença na África e também no Brasil, a dosagem fracionada da vacina contra a febre amarela foi proposta como uma estratégia alternativa, pois os centros responsáveis pela produção não conseguiriam cobrir a demanda exigida para o controle da doença. A

abordagem da vacina fracionada se baseia na quantidade mínima necessária para estimular a produção de anticorpos neutralizantes (1000 UI) (WHO, 2017b). Foram realizados estudos com diferentes diluições da dose padrão da vacina 17DD (27476 UI) que confirmaram soroconversão dos indivíduos quando usado acima de 587 UI por dose (50 vezes menor do que a dose da vacina 17DD), porém só foi possível observar a cinética de viremia com pico no 5º dia após vacinação e identificar a presença de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IFN- γ , utilizando uma dose 10 vezes menor, de 3013 UI (CAMPI-AZEVEDO et al., 2014; MARTINS et al., 2013), o que foi aprovado pela OMS (WHO, 2017b). No Brasil, após o início de diversos casos humanos de febre amarela na região sudeste, foi lançada, no final de janeiro de 2018, uma campanha de vacinação com a dose fracionada da vacina 17DD, em 69 cidades dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, com apoio da OMS e Organização Pan-Americana da Saúde (OPS) (PAHO, 2018). A dose fracionada representa um quinto da dose completa da vacina 17DD, quantidade suficiente para promover soroconversão e proteger a população (PAHO, 2018).

1.1.4 Imunopatologia

Devido às dificuldades e a escassez de estudos da febre amarela em modelos animais e em amostras humanas, grande parte do conhecimento sobre a resposta imune induzida pelo YFV é derivado de dados obtidos nos estudos de coortes de pessoas que receberam a vacina YFV-17D.

Semelhante a outros flavivírus (JOHNSTON et al., 2000; PALUCKA, 2000; LIBRATY et al., 2001), a cepa vacinal YFV-17D infecta e ativa monócitos e células dendríticas levando a indução da resposta imune inata nos primeiros dias após a vacinação. A vacinação antiamarílica provoca uma infecção viral aguda transitória e controlada, sendo o pico de viremia observado entre 3 e 7 dias após a imunização em 60% dos vacinados (GAUCHER et al., 2008). A resposta imune pós-vacinal envolve um processo de ativação e modulação da resposta imune inata e adquirida como também a produção de citocinas. A análise de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) obtidas de

indivíduos vacinados revelou que a resposta imune ao YFV-17D parece ser uma resposta complexa e polifuncional que mobiliza várias vias do sistema imune. Após a vacinação, foi observada uma ativação robusta da resposta imune inata, envolvendo fatores de transcrição das vias de interferon, inflamação e sistema complemento (GAUCHER et al., 2008; QUEREC et al., 2009). Também foi identificado um perfil de expressão gênico pós-vacinação relacionado às vias de inflamação que pode estar associado à imunogenicidade da vacina (QUEREC et al., 2009), reforçando a hipótese de que uma ativação coordenada e robusta de múltiplas vias dos sistema imune inato pode ser crítica para geração de uma resposta adaptativa potente ao YFV-17D. Com relação à resposta imune adaptativa, uma resposta de células T antígeno-específica e resposta de células B de memória duradoura parecem representar as marcas da imunidade protetora de longo prazo, pois as células T de memória específicas de YFV e os anticorpos neutralizantes podem persistir por décadas nas amostras de sangue periférico de indivíduos vacinados (POLAND et al., 1981; NIEDRIG et al., 1999; FUERTES MARRACO et al., 2015; AKONDY et al., 2009).

1.1.5 Células B e Imunidade Humoral

A resposta imune humoral se inicia quando as células B reconhecem antígenos de superfície nos patógenos e se diferenciam em células efectoras que secretam anticorpos.

As células B são geradas desde o feto, onde dão origem às células B-1 que nos adultos são auto renováveis e se localizam nas mucosas e no peritônio. Após o nascimento, o desenvolvimento das células B começa na medula óssea e é dependente de células estromais não-linfoides que proporcionam a adesão e o fornecimento de fatores de crescimento necessários para a diferenciação e proliferação das primeiras linhagens de células B. Conforme o processo de maturação avança, menor é a necessidade do contato das linhagens de B com as células estromais da medula, e assim elas migram para o eixo central da cavidade medular como células B imaturas. Por fim, para tornarem-se células B maduras, o processo final de

desenvolvimento acontece no baço (ABBAS et al., 2011; MURPHY et al., 2012).

Enquanto as células B se desenvolvem na medula óssea a partir de precursoras hematopoiéticas, as etapas do desenvolvimento (maturação e seleção) são construídas concomitantemente com o processo de rearranjo dos segmentos gênicos da imunoglobulina de cadeia pesada (V_H , D_H e J_H) (V , do inglês, *Variable*), (D , do inglês, *Diversity*) e (J , do inglês, *Joining*), juntamente com os rearranjos gênicos da imunoglobulina de cadeia leve (V_L e J_L). Os rearranjos criam um repertório de células B capazes de reconhecer mais de 5×10^{13} antígenos (revisado em PIEPER et al., 2013).

Primeiramente as células pró-B (que ainda não apresentam imunoglobulina de membrana) reorganizam os segmentos D_H e J_H , continuado por outro rearranjo que une uma região V_H ao segmento $D_H J_H$ já rearranjado. Esses primeiros rearranjos dão início ao estágio pré-B, em que as células passam a expressar o pré-BCR (um receptor formado pela cadeia pesada da imunoglobulina e proteínas substitutas de cadeia leve), proteínas de transdução de sinal como também o CD19. O pré-BCR é importante para que a célula pare de catalisar rearranjos de segmentos da cadeia pesada (exclusão alélica), o que evita a expressão de cadeias pesadas duplas, de especificidades diferentes, e também inicia o rearranjo dos segmentos gênicos de cadeia leve κ e λ (revisado em PIEPER et al., 2013).

Após duas divisões celulares, as células pré-B rearranjam os segmentos gênicos que codificam as cadeias leves (κ e λ) que, junto com a cadeia μ (pesada), rearranjada anteriormente, formam a molécula de IgM e dão origem a linhagem de células B imaturas. A partir dessa etapa, as células B imaturas migram para o baço para terminar seu processo de maturação (ABBAS et al., 2011; MURPHY et al., 2012).

No baço, as células B imaturas podem ser chamadas de células B transicionais, pois passam por dois estágios de transição tornando-se (i) células B de zona marginal, que, como sugerido pelo nome, ficam localizadas na zona marginal do baço, secretam espontaneamente anticorpos IgM inespecíficos e podem se diferenciar em plasmócitos secretores de IgM de vida curta; ou (ii) células B foliculares, caracterizadas pela expressão de IgM e IgD,

o que lhes confere a habilidade de circularem pelo sangue periférico. São as células B foliculares que formam a maior parte das células B *naïve* maduras e representam a maioria da população de células B na periferia, podendo migrar para outros órgãos linfoides secundários, alojando-se em nichos conhecidos como folículos de células B (ABBAS et al., 2011; MURPHY et al., 2012).

Os próximos estágios das células B estão relacionados aos seus processos de ativação e diferenciação que ocorrem frente a um estímulo antigênico específico. Após ativação (seja ela dependente ou não de células T CD4+), as células B sofrem expansão clonal e podem se diferenciar em plasmoblastos e células plasmáticas (ambas células secretoras de anticorpos). Os plasmoblastos são células que continuam a se dividir e expressar várias características de células B ativadas, o que permite a interação com células T. Após alguns dias, os plasmoblastos param de se dividir e, então, morrem ou se diferenciam em células plasmáticas. Algumas das células plasmáticas migram para a medula óssea onde passam a produzir uma pequena quantidade de anticorpos específicos que garantem proteção imediata no caso de uma nova infecção pelo mesmo patógeno. A outra parte das células B ativadas sofrem diferenciação em células B de memória, caracterizadas pela expressão do marcador CD27, e apresentam uma capacidade de reação mais rápida e eficaz em caso de nova infecção (ABBAS et al., 2011).

A migração das células B para órgãos linfoides secundários, como o baço, por exemplo, e o direcionamento para os folículos e formação de centros germinativos, assim como a saída dessas células e volta para circulação são reguladas por concentração de moléculas de adesão e interação entre receptores. No baço, as células B completam os nichos para construir o compartimento da zona marginal e o compartimento folicular. Nesse órgão essas células são a linha de defesa precedente contra patógenos que se encontram no sangue. Os três primeiros dias de uma infecção promovem o desenvolvimento em células plasmáticas extrafoliculares, que secretam IgM, formando complexos no combate ao patógeno, independente de células T (revisado em PIEPER et al., 2013). Algumas evidências indicam que a hipermutação somática (SHM, do inglês *somatic hypermutation*) em IgM se origina independentemente da expansão clonal dos centros germinativos, pois

a enzima AID (AID, do inglês, *activation-induced cytidine deaminase*) é expressa em baços de crianças, mas não de adultos (revisado em PIEPER et al., 2013).

A ativação de células B por meio de células T CD4⁺ ativadas, induzidas por antígenos, acontece dentro dos centros germinativos (baço e nódulos linfáticos) e essa interação leva ao desenvolvimento das células plasmáticas originadas de células transitórias, chamadas plasmoblastos (altamente secretoras de anticorpos) e das células B de memória. Essa ativação contribui para o aumento da enzima AID, que é essencial no processo das hipermutações somáticas da região variável do gene da imunoglobulina, aumentando ou diminuindo a afinidade dos anticorpos ao antígeno. Ao mesmo tempo as imunoglobulinas alteram as funções efetoras trocando a região constante de IgM por IgG, IgA ou IgE, processo catalisado por componentes da maquinaria de SHM, como a AID, por exemplo. Por fim, as células B do centro germinativo, agora células B de memória de longa duração ou plasmáticas, podem residir nos órgãos linfóides secundários ou voltar para a medula óssea, local onde não ocorrem novas divisões. (revisado em PIEPER et al., 2013).

Além da importante contribuição da imunidade celular na resposta contra o YFV, a ativação de células B e produção de Abs neutralizantes são considerados mecanismos críticos para o triunfo na prevenção à infecção pelo YFV e também um dos principais marcadores de imunogenicidade da vacina, pois podem persistir no organismo por pelo menos três décadas após o desenvolvimento da memória imunológica (SANTOS-TORRES et al., 2000). Evidências de estudos em modelos animais (camundongos e *hamsters*) mostraram que a transferência passiva de Abs YFV-específicos é totalmente eficaz na proteção contra a infecção pelo YFV (JULANDER et al., 2011; BRANDISS et al., 1986; GOULD et al., 1986).

Até o presente momento, poucos estudos têm dados sobre a resposta de plasmoblastos após a vacinação com 17D. Os achados apontam que um aumento na frequência de plasmoblastos circulantes e a produção de Abs neutralizantes YFV-específicos se iniciam entre 3 a 7 dias após a vacinação, atingindo o pico em duas semanas (QUEREC et al., 2009; BETHKE, 2011).

Estima-se que mais de 90% dos indivíduos vacinados com 17D apresentam um título basal de Abs neutralizantes YFV-específicos (MONATH, 1971).

O anticorpo é uma molécula de imunoglobulina (Ig) secretada por linfócitos B composta de duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H), ambas idênticas (Figura 3). As regiões aminoterminais são altamente variáveis, enquanto as regiões carboxiterminais são conservadas. As regiões variáveis são responsáveis pelo reconhecimento do antígeno, e possuem segmentos que entram em contato direto com o antígeno a ser reconhecido, esses segmentos hipervariáveis são regiões determinantes de complementaridade (CDR, do inglês, *Complementarity Determining Regions*) (CDR1, CDR2 e CDR3) e são margeadas por outros segmentos, menos variáveis, intitulados regiões estruturais (FR, do inglês, *Framework Regions*) (FR1, FR2, FR3 e FR4). Já as regiões constantes têm diversas funções efetoras e definem a classe da cadeia (IgM, IgG, IgD, IgA ou IgE) (revisado em TONEGAWA, 1983).

Figura 3. Representação esquemática da estrutura de um anticorpo IgG demonstrando as regiões constantes e variáveis das cadeias pesada (IgH) e leve (IgL)

FONTE: Adaptado de BOYD e JOSHI, 2014.

NOTA: Em detalhe, também estão apresentados os locos gênicos das cadeias IgH (na porção superior da figura) e IgL (à esquerda) da imunoglobulina, mostrando os segmentos genéticos V, D e J não rearranjados. O rearranjo do DNA da linhagem germinativa resulta em uma junção

dos segmentos gênicos para gerar o fragmento que codifica as regiões variáveis das cadeias IgH e IgL. No processo de rearranjo, os extremos dos segmentos gênicos estão sujeitos a ação de enzimas para produzir diversidade de sequência adicional na região de junção VDJ que codifica a Região Determinante de Complementaridade 3 (CDR3). As pontes de dissulfureto que unem as cadeias proteicas IgH e IgL estão representadas por linhas pretas

A formação das moléculas Igs se inicia já nos primeiros estágios de diferenciação de células B. A incorporação e o rearranjo dos genes V, D e J no locus da cadeia pesada germinativa acontecem através da recombinação somática por meio da ação de três enzimas (RAG-1 e -2, do inglês, *Recombination Activating Genes* e AID), que geram quebras no DNA em regiões específicas (OETTINGER et al., 1990 e revisado em DI NOIA e NEUBERGER, 2007). A diversidade do repertório de Ig decorre da escolha dos segmentos gênicos da linha germinativa V, D e J disponíveis para união e também da imprecisão nos locais de incorporação de nucleotídeos no gene, gerando diversidade juncional. A SHM ocorre tanto em partes diferentes do organismo quanto em diferentes fases da resposta imunológica. O centro germinativo é o principal local e é também onde ocorre a seleção mediada por antígeno. Além da introdução de mutações pontuais no segmento variável (IgV), o locus de cadeia pesada pode ser direcionado para a troca de classe (KÜPPERS, 2005 e revisado em DI NOIA e NEUBERGER, 2007). Existem aproximadamente 100 segmentos V, 23 D e 6 J para cadeia pesada, que podem apresentar combinação aleatória e, por isso, a variabilidade de sequências previstas é alta. Além disso, uma outra enzima específica presente nos tecidos linfoides (a TdT, desoxinucleotidiltransferase terminal) adiciona, de forma aleatória, nucleotídeos nas regiões 3' das junções entre os segmentos gênicos, contribuindo para aumentar a diversidade de sequências dos Abs, e na região das junções que se localiza o CDR3, considerada a porção mais importante do Ab para determinar a especificidade de ligação ao antígeno (revisado em DI NOIA e NEUBERGER, 2007).

Após a vacinação com 17D ou 17DD, foi constatada que a atividade neutralizante é detectada mais cedo na fração IgM (imunoglobulina do tipo M) do soro, sendo que a porção IgG é encontrada aproximadamente a partir do quarto dia pós-imunização. De fato, a IgG é a Ig mais abundante no sangue e espaços extra vasculares (MCBRIDE et al., 1982). Possui alta afinidade para ligação antígeno-específica e por isso é importante na resposta imune

secundária, induzindo a aglutinação, opsonização, ativação da via clássica do sistema complemento, neutralização de toxinas e citotoxicidade dependente de Abs. A Figura 3 mostra a estrutura esquematizada de um Ab da classe IgG. Como demonstrado, a cadeia pesada de uma IgG (50 kDa) é formada por quatro regiões constantes (C_H1 , C_H2 e C_H3) e a região variável (V_H). A cadeia leve (25 kDa) é composta por apenas uma região constante (C_L), e uma variável (V_L). Estas podem ser do tipo kappa (gene localizado no cromossomo 2) ou lambda (gene localizado no cromossomo 22) que são diferenciadas pela região C_L . Em seres humanos, a relação entre cadeias kappa e lambda no repertório geral de Abs é de cerca de 60% kappa e 40% lambda (BERMAN e FREFERICK, 1990; MCBRIDE et al., 1982).

Nas infecções por flavivírus, os Abs são capazes de prevenir a replicação viral por meio de diversos mecanismos, que incluem a inibição de invasão viral, lise em decorrência da ativação do sistema complemento e fagocitose do vírion, protegendo órgãos vitais (JULANDER et al., 2011; PARREN e BURTON, 2001; DOWD e PIERSON, 2011). A proteína viral E é um dos principais alvos da resposta humoral e orchestra os processos de montagem do vírus, brotação e entrada nas células do hospedeiro. Esta proteína possuiu três domínios distintos que contêm epitopos reconhecidos por Abs com capacidade de neutralizar o YFV. Particularmente, o domínio III (DIII) *Ig-like* é onde são encontrados os epitopos que promovem a maior parte da neutralização, embora a variabilidade individual existente nesse domínio possibilite também acarretar uma neutralização menos eficaz (DOWD e PIERSON, 2011; VRATSKIKH et al., 2013; MUKHOPADHYAY et al., 2005). Particularmente na febre amarela, os principais alvos dos Abs neutralizantes derivados desses plasmoblastos são as proteínas E e NS1. A proteína E, em especial, é o alvo mais importante dos Abs induzidos pela vacina 17D e a ligação desses Abs a essa proteína restringe a interação entre o YFV e a célula do hospedeiro (BARRETT e TEUWEN, 2009; SCHLESINGER et al., 1990). Há dois modelos para explicar o comportamento dos Abs neutralizantes mediante infecção viral, sendo eles *Single-hit* e *Multiple-hit*. O primeiro modelo sugere que os Abs necessitam de uma ligação a um único ponto crítico do vírion para promover sua neutralização. Já o segundo sugere que a neutralização ocorre

quando um único vírion é ligado por um Ab com uma estequiometria que excede o limiar, assim, para a neutralização, importaria a quantidade de Abs ligados a uma mesma partícula em momentos críticos da infecção, como por exemplo, durante a entrada do vírus na célula alvo. Este último modelo pode ser sustentado por diversas evidências incluindo o aumento da neutralização na presença do sistema complemento (DOWD e PIERSON, 2011). Nessas circunstâncias, a potência de neutralização de um Ab é um aspecto extremamente importante e altamente dependente do número de epitopos acessíveis bem como da sua afinidade por estes epitopos (PARREN e BURTON, 2001; DOWD e PIERSON, 2011). A acessibilidade do epitopo é um fator crucial e dinâmico que governa a neutralização de flavivírus. Considerando que os requisitos de ocupação são amplamente variáveis para que ocorra a neutralização, esta característica dá suporte para o modelo *Multiple-hit* (DOWD e PIERSON, 2011). Todos esses achados indicam o papel essencial dos Abs neutralizantes na contenção da infecção e na imunidade protetora contra o YFV e, portanto, reforçam a relevância do estudo da resposta humoral e a caracterização dessas moléculas nas infecções naturais bem como nos estudos clínicos que investigam a eficácia de abordagens vacinais. Uma abordagem interessante é a caracterização de sequências dos transcritos codificadores das regiões V_H e V_L de Abs neutralizantes em células B ativadas (plasmoblastos) isoladas de amostras de sangue periférico no ápice de expansão dessas células, que ocorre durante infecção natural aguda ou após uma imunização e, nesse sentido, o sequenciamento de Ig tem se mostrado uma ferramenta importante para o estudo da diversidade de células B (SUNDLING et al., 2014). Esta estratégia ajuda o desenvolvimento de abordagens preventivas e terapêuticas bem como a avaliação da segurança e eficácia da resposta imune humoral induzida por vacinas (GALSON et al., 2014). As técnicas laboratoriais e as ferramentas de bioinformática disponíveis para o estudo do repertório de Abs estão em constantes avanços e, atualmente, é possível a caracterização de sequências das regiões V_H/V_L derivadas de uma única célula (DEKOSKY et al., 2013) e a identificação de sequências antígeno-específicas (PARAMESWARAN et al., 2013). Após a vacinação ou infecção, a quantidade de células B antígeno-específicas nos

centros germinativos de órgãos linfoides secundários se expande e elas se diferenciam em células secretoras de Abs (plasmoblastos e plasmócitos) que circulam transitoriamente pelo sangue periférico (FINK, 2012). Particularmente na dengue, foi demonstrado que, após infecção viral, mais de 70% dos plasmoblastos circulantes são antígenos específicos durante o pico de expansão dessas células no sangue periférico (WRAMMERT et al., 2012), sendo importante ressaltar que esse enriquecimento de populações de células B expressando sequências Ig de relevância é crucial e necessário, pois se estima que as células B antígeno-específicas representam somente uma porção reduzida (~2%) no total de linfócitos B ($1-2 \times 10^{11}$) existentes no sangue periférico em humanos em condições fisiológicas normais (GEORGIU et al., 2014). Nesse sentido, o estudo de células em expansão durante uma infecção ou após a vacinação facilita o estudo do repertório de anticorpos presentes. No caso da febre amarela, a caracterização da cinética de plasmoblastos do repertório de Abs YFV-específicos ainda é pouco explorada. Foi mostrado em indivíduos imunizados com a vacina 17D que o pico da expansão de plasmoblastos no sangue periférico ocorre por volta de duas semanas após a vacinação (BETHKE, 2011; FINK, 2012). Também ainda pouco explorada tem sido a caracterização do repertório de Abs YFV-específicos. Apenas um estudo descreveu a clonagem e expressão de fragmentos funcionais de Abs YFV-específicos pela técnica de *Phage Display* (DAFFIS et al., 2005), metodologia que, apesar de possuir triagem de alto rendimento para especificidade, não fornece informações sobre os pares de cadeias leves e pesadas de mesma origem (WILSON e ANDREWS, 2012). Este estudo teve como principal objetivo investigar os sítios de ligação dos Abs neutralizantes durante a infecção ou imunização com a vacina 17D para melhor compreender a patogênese do YFV (DAFFIS et al., 2005). Abs neutralizantes com extraordinária potência e amplitude foram recentemente identificados em infecções por HIV (CORTI et al., 2010; SOK et al., 2013; WALKER et al., 2009), DENV (BELTRAMELLO et al., 2010), ZIKV (SAPPARAPU et al., 2016) e influenza (YASUGI et al., 2013) e o uso terapêutico dessas moléculas tem apresentado resultados bastante satisfatórios no controle da replicação viral (BELTRAMELLO et al., 2010; JOHNSON et al., 2009). No caso das arboviroses, imunoterapias baseadas em

Abs monoclonais (mAb) humanos estão atualmente em estágio muito precoce de desenvolvimento e, em um cenário caracterizado pela expansão de infecções virais, incluindo a febre amarela, a terapia baseada em mAbs neutralizantes pode representar uma estratégia alternativa promissora e segura, especialmente quando um tratamento específico e eficaz ainda não está disponível (SOLFOROSI et al., 2012; SAUTTO et al., 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar a frequência de plasmoblastos induzidos pela infecção pelo YFV e pela vacinação com a vacina YFV-17DD, bem como caracterizar e avaliar o repertório de Abs produzidos por eles.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a cinética de expansão de plasmoblastos circulantes durante a infecção e após a vacinação com a formulação vacinal YFV-17DD;
- Caracterizar a sequência dos transcritos codificadores das regiões variáveis das cadeias pesada (V_H) e leve (V_L) dos Abs derivados de plasmoblastos individuais isolados de indivíduos infectados com YFV ou vacinados com YFV-17DD durante o ápice da resposta de plasmoblastos;
- Avaliar a especificidade e poder de neutralização das imunoglobulinas recombinantes produzidas a partir das sequências V_H e V_L derivadas dos plasmoblastos isolados durante infecção ou após a vacinação com a formulação 17DD.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Figura 4. Desenho experimental

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esse projeto está contido dentro de dois estudos clínicos que envolvem indivíduos saudáveis que receberam a vacina de febre amarela (17DD) intitulado: “Avaliação da imunogenicidade da vacina contra febre amarela 17DD em populações especiais” (CAPEPesq nº 0206/10) e outro envolvendo indivíduos adultos diagnosticados com febre amarela intitulado: “Arboviroses no contexto da imunoativação crônica pelo HIV” (CAPEPesq nº 15477 e CAAE nº 59542216.3.1001.0068). Este Projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas das Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP (CAAE nº 71348717.1.0000.0068, nº do parecer 2.224.633, vide anexo A).

3.2 SUJEITOS DE PESQUISA E PLANO DE COLETA DE AMOSTRAS

Para o presente estudo, foram utilizadas alíquotas de sangue periférico de indivíduos saudáveis vacinados com 17DD e naturalmente infectados com o vírus da febre amarela selvagem, conforme previsto nos estudos principais. As coletas de sangue periférico (em média 20 ml) em tubos contendo ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose (ACD) foram realizadas em diferentes momentos pós-vacinação ou após início de sintomas, conforme descrito nos projetos principais (Figura 5). Nenhuma coleta adicional foi realizada.

Figura 5. Protocolo de coleta de amostras de sangue periférico

NOTA: A figura indica o momento em que foi realizada a avaliação da cinética de plasmoblastos e isolamento de plasmoblastos.

O grupo de vacinados incluiu indivíduos adultos saudáveis ($n=7$) que possuíam ou não histórico de febre amarela, dengue e/ou vacinação prévia com a formulação 17DD ou Butantan-DV (vacina tetravalente de vírus vivo atenuado DENV1-4, Estudo Clínico de Fase II, NCT01696422) (Tabela 1) e que foram submetidos a uma avaliação periódica nos 28 primeiros dias após a vacinação com 17DD para verificar o comportamento da resposta imune.

Tabela 1. Informações sobre os voluntários saudáveis vacinados com a formulação 17DD (n=7).

Voluntário	Idade	Sexo	Histórico de YFV	Antecedente de vacina contra YFV	Histórico de dengue ^[1]	Vacinação com TV003 prévia ^[1]	Efeitos adversos associados ao YFV
FA7001	32	F	Não	Sim	-	Não	Não
FA7002 ^[2]	28	F	Não	Sim	Não	Não	Não
FA7003	28	F	Não	Sim	Sim	Não	Erupção cutânea leve
FA7004	47	F	Não	Sim	-	Sim	Não
FA7005	52	F	Não	Não	-	Não	Não
FA7006	73	M	Sim	Sim	-	Não	Não
FA7007	56	M	Não	Sim	-	Não	Não

^[1] Informado pelo participante; ^[2] Imunização simultânea com MMR. FA – Febre Amarela. F – Sexo Feminino. M – Sexo Masculino. YFV – do inglês *Yellow Fever Virus*. TV003 – Vacina da dengue em estudo clínico, etapa B.

O grupo infectado compreendeu indivíduos diagnosticados com febre amarela silvestre (n=70) com mediana de idade de 42 anos (mínima de 19 e máxima de 73 anos), sendo 88,6% do sexo masculino. Neste grupo, 22,9% dos indivíduos alegaram terem recebido a vacina 17DD antes do diagnóstico da doença. A taxa de letalidade pela doença nesse grupo durante o período de coleta de dados foi de 37,1%, nesse percentil inclui-se dois voluntários que haviam recebido transplante de fígado devido ao agravamento da doença (Tabela 2). As coletas do grupo de infecção natural foram realizadas durante o surto ocorrido próximo à cidade de São Paulo entre janeiro de 2017 e março de 2018. O diagnóstico de febre amarela silvestre foi confirmado pela detecção de RNA viral em amostras de plasma por PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). Os indivíduos com infecção pelo YFV confirmada foram submetidos a exames clínicos e coletas periódicas nos primeiros 30 dias após o início dos sintomas.

Tabela 2. Informações sobre os indivíduos com infecção natural pelo YFV selvagem após início de sintomas (n=70).

ID	Idade	Sexo	Início de sintomas (D1)	1ª Visita (D)	Antecedente de vacina contra YFV ^[1]	Transplante de Fígado	Óbito (D)
1002	42	M	05/01/2018	11/01/2018 (D6)	Não	Não	Não
1003	47	M	07/01/2018	11/01/2018 (D4)	Não	Não	Não
1004	37	M	06/01/2018	11/01/2018 (D6)	01/2018	Não	Não
1005	65	M	08/01/2018	11/01/2018 (D4)	Não	Não	16/01/2018 (D9)
1006	40	M	23/12/2017	11/01/2018 (D14)	Não	Não	Não
1007	46	M	08/01/2018	12/01/2018 (D4)	09/01/2018	Não	Não
1008	39	M	31/12/2017	11/01/2018 (D12)	Não	Não	Não
1009	30	M	08/01/2018	11/01/2018 (D4)	Não	Não	Não
1010	48	M	08/01/2018	12/01/2018 (D4)	08/01/2018	Não	Não
1011	65	M	06/01/2018	17/01/2018 (D12)	Não	Não	Não
1012	47	M	08/01/2018	16/01/2018 (D10)	Não	Não	Não
1014	39	M	06/01/2018	12/01/2018 (D6)	Não	Não	Não
1015	61	M	08/01/2018	15/01/2018 (D4)	Não	Não	Não
1016	45	F	06/01/2018	15/01/2018 (D6)	03/01/2018	Não	Não
1017	38	M	06/01/2018	15/01/2018 (D10)	Não	Não	Não
1018	24	F	07/01/2018	19/01/2018 (D14)	Não	Não	Não
1019	19	M	14/01/2018	16/01/2018 (D4)	10/01/2018	Não	Não
1020	57	M	12/01/2018	16/01/2018 (D4)	Não	Não	20/01/2018 (D9)
1022	42	M	14/01/2018	18/01/2018 (D4)	16/01/2018	Não	Não
1023	44	M	15/01/2018	22/01/2018 (D6)	Não	Não	Não
1024	40	M	13/01/2018	19/01/2018 (D4)	Não	Não	23/01/2018 (D11)
1026	25	M	28/12/2017	19/01/2018 (D6)	Não	Não	29/01/2018 (D17)
1027	42	M	14/01/2018	22/01/2018 (D6)	Não	Não	Não
1028	71	M	13/01/2018	19/01/2018 (D4)	Não	Não	24/01/2018 (D12)
1029	37	M	16/01/2018	19/01/2018 (D4)	16/01/2018	Não	23/01/2018 (D8)
1030	56	M	17/01/2018	19/01/2018 (D4)	Não	Não	24/01/2018 (D8)
1031	21	F	13/01/2018	19/01/2018 (D6)	15/01/2018	Não	Não
1032	21	F	17/01/2018	23/01/2018 (D6)	Não	Não	Não
1033	40	M	12/01/2018	23/01/2018 (D12)	12/01/2018	Não	Não

1034	45	M	16/01/2018	23/01/2018 (D6)	11/01/2018	Não	Não
1036	63	M	18/01/2018	23/01/2018 (D6)	Não	Não	28/01/2018 (D11)
1037	50	M	12/01/2018	24/01/2018 (D12)	Não	Não	29/01/2018 (D18)
1039	20	M	17/01/2018	23/01/2018 (D6)	19/01/2018	Não	Não
1041	19	F	15/01/2018	24/01/2018 (D10)	15/01/2018	Não	Não
1042	26	M	19/01/2018	24/01/2018 (D6)	Não	Sim	01/02/2018 (D14)
1043	34	M	18/01/2018	24/01/2018 (D6)	Não	Não	29/01/2018 (D12)
1045	35	M	27/01/2018	30/01/2018 (D4)	Não	Não	Não
1046	33	M	23/01/2018	01/02/2018 (D10)	Não	Não	Não
1047	43	M	27/01/2018	01/02/2018 (D6)	16/01/2018	Não	Não
1049	19	F	30/01/2018	06/02/2018 (D6)	Não	Não	Não
1050	44	M	25/01/2018	02/02/2018 (D10)	08/01/2018	Não	Não
1051	68	F	22/01/2018	29/01/2018 (D6)	Não	Não	Não
1052	55	M	22/01/2018	29/01/2018 (D6)	10/01/2018	Não	Não
1053	42	F	23/01/2018	30/01/2018 (D6)	Não	Não	Não
1054	52	M	22/01/2018	30/01/2018 (D10)	Não	Não	Não
1055	42	M	28/01/2018	01/02/2018 (D4)	Não	Não	06/02/2018 (D10)
1057	68	M	11/03/2018	20/03/2018 (D10)	Não	Não	Não
1059	35	M	26/01/2018	05/02/2018 (D12)	Não sabe	Não	Não
1061	34	M	26/01/2018	07/02/2018 (D14)	Não	Não	15/02/2018 (D21)
1063	44	M	02/02/2018	07/02/2018 (D6)	Não	Não	15/02/2018 (D14)
1065	42	M	01/02/2018	08/02/2018 (D6)	Não	Não	18/02/2018 (D18)
1066	66	M	30/01/2018	09/02/2018 (D10)	Não	Não	15/02/2018 (D17)
1068	19	M	14/02/2018	21/02/2018 (D6)	Não	Não	Não
1069	32	M	14/02/2018	21/02/2018 (D6)	Não	Não	22/02/2018 (D9)
1070	28	M	16/02/2018	21/02/2018 (D6)	Não	Sim	28/02/2018 (D13)
1071	22	M	12/02/2018	22/02/2018 (D12)	Não	Não	Não
1072	32	M	10/02/2018	22/02/2018 (D14)	Não	Não	Não
1073	46	M	08/02/2018	23/02/2018 (D14)	Não	Não	Não
1074	60	M	23/02/2018	01/03/2018 (D4)	21/02/2018	Não	16/03/2018 (D22)
1075	54	M	25/02/2018	01/03/2018 (D6)	Não	Não	03/03/2018 (D7)
1076	60	M	25/02/2018	05/03/2018 (D10)	Não	Não	Não
1078	66	M	28/02/2018	07/03/2018 (D14)	Não	Não	05/03/2018 (D13)
1079	53	M	28/02/2018	07/03/2018 (D6)	Não	Não	11/03/2018 (D12)

1080	57	M	26/02/2018	07/03/2018 (D10)	Não	Não	Não
1081	45	M	28/02/2018	07/03/2018 (D6)	Não	Não	09/03/2018 (D8)
1082	63	M	26/02/2018	07/03/2018 (D10)	Não	Não	11/03/2018 (D14)
1083	73	M	02/03/2018	13/03/2018 (D12)	Não	Não	28/03/2018 (D27)
1084	20	M	05/03/2018	13/03/2018 (D6)	Não informado	Não	Não
1085	33	M	01/03/2018	13/03/2018 (D14)	Não	Não	Não
1086	36	M	09/03/2018	13/03/2018 (D4)	Não	Não	18/03/2018 (D10)

^[1]Informado pelo participante. F – Sexo Feminino. M – Sexo Masculino. YFV – do inglês, *Yellow Fever Virus*. D – dias após início de sintomas. A 1ª visita se refere ao dia em que foi realizada a primeira coleta.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DE EXPANSÃO DE PLASMOBLASTOS POR IMUNOFENOTIPAGEM DE SUPERFÍCIE

A avaliação da cinética de expansão de plasmoblastos circulantes foi realizada por meio da técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica. Para tal, alíquotas de 100 µl de sangue periférico fresco coletadas dos grupos de voluntários vacinados (dias 0 - pré-vacinação, 7, 14 e 28 - pós-vacinação) e indivíduos infectados (dias 4, 6, 10, 12, 14 e 30 após início dos sintomas) (Figura 5) foram incubadas com uma mistura de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos (Tabela 3) por 30 minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz. O marcador de viabilidade celular LIVE/DEAD® Fixable Red Dead Cell Stain Kit (Life Technologies) foi utilizado a fim de discriminar células vivas e mortas.

Após incubação, as hemácias presentes nas amostras foram lisadas pela incubação com a solução *FACs lysyng solution* (BD Biosciences) por 10 minutos e, posteriormente, as células foram centrifugadas a 600 g por 5 minutos. Após remoção do sobrenadante, o botão de células foi submetido a duas séries de lavagens com solução tampão PAB (0,1% de albumina sérica bovina, BSA; e 0,04% Azida Sódica em tampão salina fosfato - PBS). O sedimento de células resultante foi ressuspensionado em solução de fixação (1% de paraformaldeído em PBS 1x, pH 7,2) incubada por 15 minutos e submetido a outras duas séries de lavagens com solução tampão PAB. As células, agora fixadas, foram então ressuspensionadas em solução PBS 1x e mantidas a 4°C, protegidas da luz, até a aquisição no citômetro de fluxo *BD FACSAria II* (BD

Biosciences). A população de plasmoblastos foi definida como CD19⁺ CD3⁻ CD14⁻ CD20^{-low} CD27^{high} CD38^{high} (FINK, 2012).

Tabela 3. Painel de anticorpos específicos de marcadores de superfície utilizado para identificação da população de plasmoblastos.

Anticorpos	Clones	Fluocromos
CD3 ^[1]	UCHT1	PE-CF459
CD14 ^[1]	MφP9	PE-CF459
CD19	SJ25C1	APC-Cy7
CD20	L25	PerCP
CD27	O323	APC
CD38	HN7	FITC

^[1] *Dump channel.*

3.4 ISOLAMENTO DE PLASMOBLASTOS INDIVIDUAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A seleção de amostras para a realização do isolamento de plasmoblastos individuais foi feita baseando-se nos resultados de imunofetipagem das amostras de sangue periférico fresco. No caso dos indivíduos vacinados, os momentos ideais para o isolamento de plasmoblastos foram definidos para o sétimo e décimo-quarto dias após a vacinação, corroborando com dados prévios da literatura (MARTINS et al., 2007; BETHKE, 2011). Para os indivíduos infectados pelo vírus selvagem, o isolamento de plasmoblastos foi realizado nas amostras que apresentaram frequência elevada dessas células dentro da população de células B total. A seleção de amostras baseada na frequência de plasmoblastos circulantes foi sustentada por estudos da literatura sobre a resposta de células B ativadas em outras flavivirose, incluindo a dengue (WRAMMERT et al., 2012), que demonstraram a predominância de plasmoblastos antígeno-específicos (representando > 70% das células B circulantes) durante o pico de expansão dessas células.

O isolamento de plasmoblastos (célula única) foi realizado utilizando o citômetro *BD FACSAria II* (BD Bioscience). Inicialmente, as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas pelo método de diferença de gradiente usando a solução Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare

Life Sciences) (TILLER et al., 2008). Em seguida, essas células foram marcadas com o mesmo conjunto de anticorpos fluorescentes utilizados na imunofenotipagem de superfície (Tabela 3). Os plasmoblastos (células vivas $CD19^+ CD3^- CD14^- CD20^{low} CD27^{high} CD38^{high}$) (BETHKE, 2011; GEORGIU et al., 2014; GALSON et al., 2014; TILLER et al., 2008) foram isolados individualmente em poços de placas para PCR de 96 poços contendo tampão para extração e preservação de RNA refrigerado (*Lysis buffer*: 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 6.25 mM DTT, 250 ng/well yeast tRNA, Life Technologies; 20 U RNase inhibitor, New England Biolabs [NEB]; 0.0625 μ l/well IGEPAL CA-630, Sigma) (EBERWINE et al., 2014). A primeira coluna das placas de 96 continha apenas tampão (sem células), para utilização como controle negativo para as PCRs. As placas foram imediatamente estocadas a $-80^\circ C$ para posterior amplificação e sequenciamento das regiões das cadeias V_H e V_L das Ig.

3.5 AMPLIFICAÇÃO DE IG DE CÉLULA ÚNICA

Para cada célula isolada, foi realizada a síntese de cDNA e posterior *nested-PCR* para a síntese e amplificação de DNA complementar da região V_H e V_L (Figura 6) utilizando *primers* randômicos previamente publicados (TILLER et al., 2008; WARDERMANN et al., 2003) (Tabela 4).

Figura 6. Procedimentos para caracterização de Abs derivados de plasmoblastos circulantes isolados

NOTA: Os plasmoblastos isolados individualmente tiveram suas sequências de imunoglobulinas amplificadas e sequenciadas para posterior caracterização.

A síntese de cDNA foi realizada diretamente nas placas com poços contendo uma célula imersa em tampão (20 µl de *Lysis buffer*). Em cada poço foi adicionada uma mistura contendo 1 µl de 150 ng de *random hexamer primer* (IDT, Integrated DNA Technologies), 10mM de dNTP (Life Technologies), 200 U da enzima *SuperScript III* Reverse Transcriptase (Life technologies) e 1 µl de água ultrapura estéril. A reação de transcrição reversa foi realizada a 42°C durante 10 minutos, 25°C durante 10 minutos, 50°C durante 60 minutos e 94°C durante 5 minutos.

Utilizando um conjunto de *primers* randômicos específicos para cada cadeia da imunoglobulina (V_H , V_{Lk} , e V_{La}) (Tabela 4), as primeiras reações de amplificação foram realizadas incubando-se 3 µl do produto da reação de síntese de cDNA com *10x Hot Star Buffer* (Qiagen), 25 mM $MgCl_2$, 10 mM de dNTP *mix* (Life Technologies), e 2 U de *HotStarTaq Plus DNA Polymerase* (Qiagen) nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos, 50 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, e 72°C por 55 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Em seguida, as *nested-PCRs* foram realizadas com 3 µl do produto da primeira amplificação em presença de *10x Hot Star Buffer* (Qiagen), *5x Q-solution* (Qiagen), 10 mM de dNTP *mix* (Life Technologies) e um segundo conjunto de *primers* randômicos específicos para V_H , V_{Lk} , e V_{La} , e 2 U de *HotStarTaq Plus DNA Polymerase* (Qiagen) (Tabela 4). As reações foram incubadas em termociclador nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos, 50 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C (V_H e V_{Lk}) ou 60°C (V_{La}) por 30 segundos, e 72°C por 45 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os fragmentos amplificados foram analisados após eletroforese em gel de agarose 2% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies) imerso em solução tampão TBE (0,045 M Tris-Borato; 1 mM EDTA). A visualização e foto documentação dos fragmentos amplificados foram realizadas utilizando o *Alphamager HP Imaging System* (Alpha Innotech) sob luz ultravioleta. As dimensões dos fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen, Life Technologies).

Tabela 4. Sequência e conjunto de primers utilizados para a amplificação das regiões variáveis da cadeia pesada e leve (kappa e lambda) das imunoglobulinas de células únicas isoladas.

PCR	Primer	Sequências Senso (5'-3')	Sequências Anti-senso (3'-5')
Primeira PCR	Cadeia	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG	GGAAGGTGTGCACGCCGTGGTC
	Pesada	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG	
		CCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAG	
		CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG	
	Cadeia	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA
	Leve	CTCTTCCTCTGCTACTCTGGCTCCAG	
	Kappa	ATTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG	
	Cadeia	GGTCCTGGGCCCAGTCTGTGCTG	CACCAGTGTGGCCTTGTGGCTTG
	Leve	GGTCCTGGGCCCAGTCTGCCCTG	
	Lambda	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG GTTCTTGGGCAATTTTATGCTG GGTCCAATTCYAGGCTGTGGTG GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG	
Segunda PCR	Cadeia	GGTGGTGAATTGCGAGGTGCAGCTGGTGCAG	GGTGGTGTAGCTGAGGAGACGGTGACC
	Pesada	GGTGGTGAATTCGGAGGTGCAGCTGGTGCAG	
		GGTGGTGAATTCGGAGGTGCAGCTGGTGGAG	
		GGTGGTGAATTCGGAGGTGCAGCTGTTGGAG	
		GGTGGTGAATTCGGAGGTGCAGCTGCAGGAG	
		GGTGGTGAATTCGCAGGTGCAGCTACAGCAG	
		GGTGGTGAATTCGCAGGTTGAGCTGGTGCAG	
		GGTGGTGAATTCGCAGGTCCAGCTGGTACAG	
		GGTGGTGAATTCGCAGGTGCAGCTGGTGGAG	
		GGTGGTGAATTCGGAAGTGCAGCTGGTGGAG	
		GGTGGTGAATTCGCAGCTGCAGCTGCAGGAG	
		GGTGGTGAATTCGCAGGTACAGCTGCAGCAG	
	Cadeia	GGTGGTGAATTCAATGACCCAGWCTCCABYCWCCCTG	GGTGGTAGCAGTGGCTGCCGTTTGATYTCCAC
	Leve	GGTGGTGAATTCAGACATCCAGATGACCCAGTC	CTTGGTC
	Kappa	GGTGGTGAATTCAGACATCCAGTTGACCCAGTCT	GGTGGTAGCAGTGGCTGCCGTTTGATCTCCAG
		GGTGGTGAATTCAGCCATCCGGATGACCCAGTC	CTTGGTC
		GGTGGTGAATTCAGATATTGTGATGACCCAGAC	GGTGGTAGCAGTGGCTGCCGTTTGATATCCACT
		GGTGGTGAATTCAGATATTGTGATGACTCAGTC	TTGGTC
		GGTGGTGAATTCAGATGTTGTGATGACTCAGTC	GGTGGTAGCAGTGGCTGCCGTTTAATCTCCAGT
		GGTGGTGAATTCAGAAATTGTGTTGACACAGTC	CGTGTC
		GGTGGTGAATTCAGAAATAGTGATGACGCACTG	
		GGTGGTGAATTCACAGAAATTGTGTTGACGCACTCT	
		GGTGGTGAATTCAGACATCGTGATGACCCAGTC	
	Cadeia	GGTGGTGAATTCACAGTCTGTGCTGACKCAG	GGTGGTACTCGAGGGYGGGAACAGAGTGACCG
	Leve	GGTGGTGAATTCACAGTCTGCCTGACTCAG	
	Lambda	GGTGGTGAATTCATCCTATGAGCTGACWCAG	
		GGTGGTGAATTCACAGCYTGTGCTGACTCA	
		GGTGGTGAATTCAAATTTTATGCTGACTCAG	
		GGTGGTGAATTCACAGRCTGTGGTGACYCAG	

3.6 SEQUENCIAMENTO DOS SEGMENTOS V_H E V_L

Os produtos amplificados foram sequenciados utilizando-se iniciadores complementares às regiões constantes de Ig (sequências anti-senso)

específicos para cada tipo de cadeia. Primeiramente, as alíquotas dos produtos da *nested-PCR* foram purificadas utilizando *ExoSAP-IT* (Affymetrix, Inc.), de acordo com as recomendações do fabricante, e a concentração foi verificada utilizando o *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen, Life Technologies). Em alíquotas de 10 µl, 10 ng de cada produto amplificado foram incubados com 1 µl de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 2 µL de tampão *Save Money 5x* (200 mM Tris-HCl; 5 mM MgCl₂; pH 9,0), 10 pmoles de *primer* e água (qsp 20 µL), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos, e 60°C por 4 minutos. Em seguida, os produtos foram purificados por precipitação em álcool. A cada amostra, foram adicionados 80 µL de isopropanol 75% gelado. Após homogeneização, as amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz e em seguida centrifugadas a 3.200 g por 45 minutos. Após a remoção do sobrenadante por inversão, o botão de DNA foi homogeneizado em 150 µL de etanol 70% gelado. Foi realizada nova centrifugação a 3.200 g por 15 minutos. O excesso de etanol foi cuidadosamente descartado, com evaporação conduzida em banho-seco a 80°C por 2 minutos. As amostras foram homogeneizadas com 3,4 µL de formamida e *Blue Dextran*-EDTA (Applied Biosystems) na proporção de 5:1, desnaturadas a 95°C por 3 minutos, colocadas no gelo por 2 minutos e submetidas à eletroforese em sequenciador automático modelo *ABI-Prism 3130 DNA Sequencers* (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos foram visualizadas com o auxílio do programa *4peaks* (<http://mekentosj.com/science/4peaks/>).

3.7 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DAS REGIÕES V_H E V_L DE GEL DE AGAROSE

Os poços das placas cujos produtos de PCR apresentaram sequências produtivas para as regiões V_H e V_L foram purificados utilizando-se o método de purificação dos fragmentos de DNA de interesse em gel de agarose. O volume de 35 µl do produto da *nested-PCR* foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2% corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen, Life

Technologies). Durante visualização dos produtos amplificados sob luz ultravioleta (*Alphamager HP Imaging System*, Alpha Innotech) e baseando-se no padrão de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen, Life Technologies), as bandas correspondentes aos fragmentos de interesse (~300 pb) foram recortadas utilizando bisturi estéril e colocadas em microtubos de 1,5 ml contendo 600 µl de *ADB Buffer* (*Zymoclean Gel DNA Recovery*, Zymo), seguido de incubação em banho seco a 55°C por 10 minutos, para que o gel de agarose se dissolvesse. A solução totalmente líquida foi colocada em uma coluna (*Zymo-Spin™ Column*, Zymo) alocada em um tubo coletor de 2 ml, centrifugada durante 1 minuto a 16000 g. A coluna foi alocada em novo tubo coletor para dois procedimentos de lavagem com 200 µl de *DNA Wash Buffer* (*Zymoclean Gel DNA Recovery*, Zymo) seguida de centrifugação de 1 minuto a 16000 g. A coluna foi conectada a um microtubo de 1,5 ml para adição de 10 µl de *DNA Elution Buffer* (Zymo) e centrifugação por 2 minutos a 16000 g para eluir o DNA.

3.8 CLONAGEM DE FRAGMENTOS DE DNA

3.8.1 Ligaço Inseto-Plasmdeo

Os fragmentos de DNA codificadores das regies V_H e V_L purificados de gel de agarose foram ligados a plasmdeos especficos contendo a regio constante da imunoglobulina, conforme descritos na Tabela 5. Primeiramente, cada plasmdeo foi linearizado pela digesto com enzimas de restrio (New England Biolabs Inc.) (Tabela 5), em reaes de volume final de 50 µl contendo 1 µg de DNA plasmidial, 10 U da enzima de restrio e 5 µl do tampo da enzima, que foram incubadas a 37°C (*NheI* e *XhoI*) ou 60°C (*BstEII*) por 1 hora e, quando necessrio, inativadas a 65°C por 20 minutos (*NheI* e *XhoI*). Em seguida, a reao de ligao foi realizada utilizando o reagente *GA Master Mix* (Gibson Assembly[®]), de acordo com as instrues do fabricante, 2 µl (contendo 100 ng) do vetor plasmidial linearizado e 8 µl do fragmento de DNA (V_H ou V_L , oriundo da purificao do gel) foram adicionados a 10 µl de *GA Master Mix*, e a mistura foi incubada a 50°C durante 1 hora.

Tabela 5. Características dos vetores utilizados para a transformação bacteriana.

Cadeia	Vetor	Origem	Enzima de Restrição	Antibiótico de Seleção	Fabricante
IgH	pFUSEss-CHlg-rhG1	<i>Macaca mulatta</i>	NheI	Zeomicina	Invivogen
IgLk	pFUSE2ss-CLlg-rhK	<i>Macaca mulatta</i>	BstEII	Blasticidina	Invivogen
IgLλ	pFUSE2ss-CLlg-rhK	<i>Macaca mulatta</i>	XhoI	Blasticidina	Invivogen

3.8.2 Transformação Bacteriana

A transformação bacteriana foi realizada utilizando o reagente *Mix and Go* (Zymo Research), de acordo com as instruções do fabricante. Após o descongelamento dos tubos contendo células competentes *Escherichia coli* DH5α (*Mix and Go cells*) em gelo, foram adicionados 5 µl do DNA plasmidial linearizado. A mistura foi homogeneizada delicadamente e incubada no gelo durante 15 minutos. Para otimizar a transformação foram adicionados 100 µl de meio de cultura S.O.C. (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM glicose, ThermoFisher) e essa mistura foi incubada a 37° sob agitação (200 a 300 rpm) durante 1 hora. Em seguida, as soluções de transformação foram semeadas em placas de petri contendo meio de cultura sólido suplementado com Blasticidina (*Fast Media*® *Blas TB*, InvivoGen) para as cadeias leves (Kappa e Lambda) ou Zeomicina (*Fast Media*® *Zeo TB*, InvivoGen) para a cadeia pesada da imunoglobulina (Tabela 5) e incubadas a 37°C durante 18 horas.

3.8.3 PCR de Colônia

De cada placa de petri, um total de oito colônias (as maiores e mais visíveis) foram selecionadas e transferidas para tubos aglomerados (*Corning*® *96 well PP 1.2 ml cluster tubes*, Sigma-Aldrich/Merck) contendo 100 µl de meio à base de *Lysogeny* suplementado com Zeomicina (para as cadeias pesadas) ou Blasticidina (para cadeias leves Kappa ou Lambda) que foram posteriormente incubados a 37°C sob agitação (200 a 300 rpm) durante 18 horas. Após essa etapa, foi realizada a PCR de colônia adicionando-se 1,5 µl de cada tubo de cultivo das colônias em solução contendo 12,5 µl de *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix* (ThermoFisher); 1,25 µl de *primer forward*

(5' CGTTACAGATCCAAGCTGTGAC 3'); 1,25 µl de *primer reverse*, específico para cada cadeia (pesada – 3' TTCAGGGAAGTAGTCCTTGACC 5'; kappa – 3' CTCTGGGATAGAAGTTATTCAGCAG 5' e lambda – 3' CGTTACAGATCCAAGCTGTGAC 5') e 8,5 µl de água ultrapura estéril, obtendo-se uma concentração final de primers de 0,5 mM. A reação foi incubada em termociclador nas seguintes condições: 10 segundos a 98°C; 30 ciclos de: 1 segundo a 98°C, 5 segundos a 66°C e 15 segundos a 72°C; por fim 1 minuto a 72°C. Os produtos de cada reação foram analisados após eletroforese em gel de agarose 2% corado com SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Life Technologies) imerso em solução tampão TBE (0,045 M Tris-Borato; 1 mM EDTA). A visualização e foto documentação dos fragmentos amplificados foram realizadas utilizando o *AlphaImager HP Imaging System* (Alpha Innotech) sob luz ultravioleta. As dimensões dos fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen, Life Technologies). As bactérias transformadas com plasmídeos contendo o inserto de interesse produziam bandas de 600 pb.

3.8.4 Purificação do DNA Plasmidial Contendo o Inserto de Interesse

O DNA plasmidial contendo o inserto de interesse foi purificado utilizando o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente, o restante do volume contido nos tubos aglomerados contendo colônias bacterianas selecionadas após PCR foram transferidos para 3 ml de meio líquido contendo Zeomicina (cadeia pesada) ou Blastidicina (cadeias leves) e incubados a 37°C sob agitação (200 a 300 rpm) durante 18 horas. Em seguida, 2 ml desses conteúdos foram centrifugados por 3 minutos a 16000 g. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os botões de células bacterianas transformadas foram ressuspensos em 250 µl de *Buffer P1* (QIAGEN) contendo RNase A. Foram também adicionados 250 µl de *Buffer P2* (QIAGEN) e o conteúdo homogeneizado gentilmente para evitar a degradação do DNA plasmidial. Seguiu-se a adição de 350 µl de *Buffer N3* (QIAGEN) e, após homogeneização, os tubos foram centrifugados a 16000 g durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para as colunas (*QIAprep 2.0 spin columns*, QIAGEN)

alocadas em tubos coletores à vácuo. Após a passagem nas colunas, as mesmas foram lavadas com 500 µl de *Buffer PB* (QIAGEN) e posteriormente com 750 µl de *Buffer PE* (QIAGEN). As colunas foram transferidas para novos tubos coletores e centrifugadas a 16000 g por 1 minuto para remoção de resíduos. As colunas foram realocadas em microtubos de 1,5 ml e foram adicionados 50 µl de *Buffer EB* (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) para eluição do DNA. Após incubação por 1 minuto em temperatura ambiente, as colunas foram centrifugadas a 16000 g por 1 minuto. A concentração das amostras foi mensurada em fluorímetro Qubit (Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) e um novo sequenciamento foi realizado (conforme descrito no item 3.6) para verificar a posição e o sentido das sequências inseridas nos vetores.

3.9 TRANSFEÇÃO DOS VETORES CONTENDO O INSERTO DE INTERESSE

A expressão das imunoglobulinas recombinantes (rhIgG) foi realizada pela transfecção de células HEK293F com plasmídeos contendo a regiões V_H e V_L derivadas da mesma célula. Células HEK 293F (1×10^6 células) foram transferidas para tubos de cultura com tampas de respiração (Greiner culture tubes, Sigma-Aldrich/Merck) contendo 700 µl de *Opti-MEM* (Reduced Serum Media, ThermoFisher). Foram adicionados 2 µg de cada plasmídeo (V_H e sua V_L correspondente) e 9,75 µl de Lipofectamina (Lipofectamine[®] LTX with Plus[™] Reagent, ThermoFisher) seguido por incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir a combinação de todos os reagentes. Os tubos de cultura foram mantidos a 37°C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂, sob agitação (300 rpm), durante 18 horas. Após esse período, cada tubo foi suplementado com meio Free Style[™] 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific) enriquecido com potenciadores: 15 µl de H1, 150 µl de H2 (ExpiFectamine[™] 293, Thermo Fisher Scientific). Os tubos foram mantidos a 37°C, em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂, durante 7 dias.

3.10 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS rhlGgs

A detecção e a quantificação das rhlGgs produzidas pelas células HEK293F transfectadas foram realizadas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent*). Uma placa de 96 poços foi revestida com 100 µl do anticorpo G18-145 anti-IgG humano (contendo todas as subclasses gamma) (BD Biosciences) na diluição de 5µg/ml em solução de PBS. Após lavagem com solução de PBS contendo 0,05% de Tween® 20 (Sigma-Aldrich, Merck), foi adicionada solução de bloqueio (300 µl de PBS com 5% de leite desnatado) e a placa foi incubada a 37°C por 1 hora. A solução de bloqueio foi descartada e as amostras de sobrenadante contendo imunoglobulinas recombinantes foram adicionadas aos poços nas diluições 1:80, 1:320 e 1:1280 e incubadas a 37°C por uma hora. Após a incubação, foram realizadas quatro lavagens com solução de PBS contendo 0,05% de Tween® 20 (Sigma-Aldrich, Merck). Em seguida, a detecção foi realizada adicionando-se 100 µl de anticorpo anti-IgG humano produzido em cabra (específico para cadeia gamma) conjugado com HRP (do inglês, *Horseradish Peroxidase*) na diluição de 1:10000 (Southern Biotech). Após incubação a 37°C durante uma hora, os poços foram submetidos a oito lavagens com 300 µl de solução de PBS contendo 0,05% de Tween® 20 (Sigma-Aldrich, Merck). Para revelação, foram adicionados 100 µl de substrato TMB (Tetrametilbenzidina) 100 µg/ml em tampão acetato/ácido cítrico 0,1 M pH 6 e peróxido de hidrogênio a 0,0045%, seguido por incubação das placas a 20-23°C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 100 µl de solução de parada (ácido sulfúrico 4,7 N) em cada poço e os resultados foram obtidos em até 30 minutos por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. Como controle positivo foi utilizada amostra de rhlGg DENV-específica isolado em um estudo anterior do nosso grupo (MAGNANI, et al., 2017). Para controle negativo, foi adicionado apenas meio de cultura celular.

3.11 ENSAIOS DE LIGAÇÃO DAS rhlgGs A YFV-17D

A ligação dos anticorpos recombinantes à cepa YFV-17D (análise de afinidade) foi avaliada por ELISA. As placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µl do anticorpo monoclonal de camundongo antinflavivirus 4G2 (Millipore, Merck), na diluição de 1:1000 em tampão de carbonato 50 mM (pH<9), a 4°C. Em seguida, foi realizada lavagem com Tween® 20 (Sigma-Aldrich, Merck) 0,05% em PBS e bloqueio com 300 µl de solução de PBS com 5% de leite desnatado por 1 hora a 37°C. A solução de bloqueio foi descartada e 100 µl da amostra de vírus (YFV-17D) na diluição 1:100 foram adicionadas aos respectivos poços seguido de incubação a 37°C por 1 hora. As placas foram lavadas com 300 µL de PBS cinco vezes e 100 µl das imunoglobulinas recombinantes foram adicionadas e incubadas a 37°C em câmara úmida durante 1 hora. Para o controle negativo, utilizou-se apenas meio de cultura R10 (RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal) utilizado na cultura de vírus. Após novo ciclo de lavagens, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG humano produzido em cabra (específico para cadeia gamma) conjugado com HRP na diluição de 1:10000 (Southern Biotech), e as placas foram incubadas novamente a 37°C em câmara úmida durante 1 hora. Após a lavagem das placas, a revelação foi realizada pela adição de 100 µl de TMB 100 µg/ml em tampão acetato/ácido cítrico 0,1 M pH 6 e peróxido de hidrogênio a 0,0045% e incubação das placas a 20-23°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm após a interrupção da reação com 100 µl de solução de parada.

3.12 TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE FOCOS

A capacidade das imunoglobulinas isoladas em neutralizar o vírus YFV-17D *in vitro* foi verificada pelo teste de neutralização por redução de focos (FRNT, do inglês, *Focus Reduction Neutralization Test*). As amostras de sobrenadante das culturas de HEK293F contendo rhlgGs foram primeiramente utilizadas em sua concentração total (sobrenadante puro) e, apresentando propriedade neutralizante, foram diluídas em solução estéril de PBS de forma seriada (1:5, 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280, 1:5120 e 1:20480) para avaliar o

potencial de neutralização. Assim como no PRNT (do inglês, *Plaque Reduction Neutralization Test*), as amostras de rhlG foram desafiadas contra a cepa YFV-17D e posteriormente transferidas para placas de 96 poços (Corning® 96 Well CellBIND® Microplates, Sigma Aldrich) com monocamada de células Vero (3×10^4 por poço) pré-cultivadas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino.

Foram incubados 60 µl de suspensão contendo vírus YFV-17D (4000 FFU/ml) com 60 µl das amostras de sobrenadante com rhlGs durante uma hora a 37°C. Após esse período, 100µl dessa mistura foi transferida nas placas contendo a monocamada de células Vero que teve o meio RPMI suplementado removido. As placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida durante 1 hora e 30 minutos e, após a incubação, a mistura vírus-rhlG foi aspirada seguindo-se adição de 150 µl de meio de semissólido pré-aquecido (1% de metilcelulose diluída em OptiMax) em cada poço. As placas foram gentilmente agitadas e incubadas a 37°C em câmara úmida durante 4 dias. O meio semi-sólido foi aspirado e as células fixadas pela adição de 100 µl por poço de solução de PFA 1% em PBS e incubação por 30 minutos a temperatura ambiente (20-23°C). Em seguida, foram realizadas três lavagens com 300 µl de Tween® 20 (Sigma-Aldrich, Merck) 0,05% em PBS e então acrescentada 100 µL/poço da solução de permeabilização (CytoPerm™, BD Biosciences). Após incubação de 5 minutos a temperatura ambiente (20-23°C), a solução de permeabilização foi aspirada e foi adicionado o anticorpo monoclonal primário anti-flavivirus 4G2 produzido em camundongo (Millipore, Merck) na diluição de 1:2000 em solução de permeabilização (CytoPerm™ Wash, BD Biosciences; 50 µl/poço) seguido por incubação em temperatura ambiente (20-23°C) por 2 horas e a 4°C por 18 horas. Após esse período, as placas foram lavadas com Tween® 20 (Sigma-Aldrich, Merck) 0,05% em PBS por três vezes, seguido por uma lavagem adicional com CytoPerm™ Wash (BD Biosciences; 100 µl/poço). Após lavagem, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG humano produzido em cabra conjugado com HRP (Sinapse Biotecnologia) na diluição 1:2000 em solução de permeabilização (CytoPerm™ Wash, BD Biosciences; 50 µl/poço) e as placas foram incubadas a temperatura ambiente (20-23°C) por 2 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas duas vezes com 0,05% de Tween®

20 (Sigma-Aldrich, Merck) em PBS, e uma vez com CytoPerm™ Wash (BD Biosciences). Após as lavagens, a revelação foi realizada pela adição de substrato de peroxidase *TrueBlue* (Sinapse Biotecnologia, 40 µl/poço) seguido pela incubação das placas a temperatura ambiente (20-23°C) por 10 minutos. A placa foi lavada gentilmente com água deionizada estéril, a leitura realizada no equipamento AID ELISpot Reader e as imagens avaliadas utilizando o Biospot® Software. Em todas as placas, foram utilizados como controles: (i) um poço contendo apenas vírus YFV-17D; (ii) outro sem vírus algum; (iii) e um poço em que foi adicionada a mistura da cepa YFV-17D com rhIgG anti-SIV, como controle negativo.

3.13 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados demográficos e clínicos dos pacientes obtidos foram organizados utilizando a plataforma *RedCap Consortium* e consolidados pelo *Stata Software*.

Os dados de imunofenotipagem por citometria de fluxo foram analisados utilizando o programa FlowJo 10.0.6 (Try Star, USA). A frequência de plasmoblastos foi determinada pela análise *Booleana* para o seguinte fenótipo: células CD20^{-low}, CD27^{high} e CD38^{high} dentro do total de células vivas CD19⁺ CD3⁻ CD14⁻ (Figura 7). A comparação estatística das frequências de plasmoblastos foi realizada utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Todas as comparações que resultaram em $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

Figura 7. Estratégia de análise da frequência de plasmoblastos circulantes

NOTA: Os plasmoblastos foram definidos como células vivas $CD19^+$ $CD3^-$ $CD14^-$ $CD20^{-/low}$ $CD27^{high}$ $CD38^{high}$ utilizando a análise Booleana, sendo $CD20^{-/low}$ $CD27^{high}$ $CD38^{high}$ expressos simultaneamente, partindo da população total de células B $CD19^+$. Na figura acima, está apresentada os dados da imunofenotipagem por citometria de fluxo do voluntário 1023, no 6º dia após início de sintomas.

A análise das sequências de nucleotídeos e da proteína, e a identificação dos genes germinativos V (*Variable gene*), D (*Diversity gene*) e J (*Joining gene*) da Ig bem como de níveis de hipermutações somáticas foram realizadas utilizando a ferramenta IMGT/V-QUEST (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest). As sequências foram consideradas clonalmente relacionadas quando foram classificadas com os mesmo segmentos V(D)J e quando as regiões da CDR3 apresentaram o mesmo

tamanho e sequências semelhantes ou iguais. Isso foi avaliado para as cadeias V_H e V_L que formavam o par correspondente. Os parâmetros identificados nas sequências obtidas para o grupo vacinado e naturalmente infectado foram comparados usando teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Para realizar a curva referente a neutralização *in vitro* em diferentes concentrações foi realizado um ajuste não linear no conjunto de dados, baseado em uma curva sigmoide assimétrica de cinco parâmetros, em que o eixo X apresenta-se em escala de $\log_{10}$; sendo assim, o EC50 (concentração de anticorpo recombinante necessário para neutralizar 50% do vírus *in vitro*) foi calculado no ponto de inflexão da curva.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CINÉTICA DE EXPANSÃO DE PLASMOBLASTOS CIRCULANTES

Para determinar a frequência de plasmoblastos circulantes, foi utilizada a análise Booleana, que permitiu avaliar o percentual de células identificando o perfil de expressão de três marcadores, neste caso: $CD20^{low}$ $CD27^{high}$ $CD38^{high}$, dentro do total de células B vivas $CD19^{+}$ $CD3^{-}$ $CD14^{-}$ do sangue periférico.

4.1.1 Indivíduos Vacinados

A análise da cinética de expansão de plasmoblastos induzida pela vacina 17DD nas amostras de sangue periférico fresco dos sete voluntários incluídos neste estudo está apresentada na Figura 8 e descrita na Tabela 6. Nestas amostras, as frequências de plasmoblastos circulantes dentro da população total de células B vivas $CD19^{+}$ $CD3^{-}$ $CD14^{-}$ detectados entre a pré-vacinação e nos dias 7, 14 e 28 pós-vacinação não apresentaram diferenças significativas (Tabela 7). De acordo com a mediana das frequências detectadas nas amostras dos voluntários, não foi observada expansão significativa de plasmoblastos circulantes comparando-se à frequência basal detectada nesse grupo. Avaliando-se individualmente, apenas o voluntário 7007 apresentou expansão de plasmoblastos relevante, no 14º dia após vacinação, quando atingiu uma frequência de plasmoblastos circulantes 20 vezes maior (6,24%) àquela observada antes da vacinação (0,272%).

Figura 8. Cinética de expansão de plasmoblastos circulantes em voluntários vacinados com a formulação 17DD (n = 7)

NOTA: **(A)** Frequência de plasmoblastos em porcentagem (%) dentro do total de células B vivas $CD19^+ CD3^+ CD14^-$ antes e após a vacinação. Não houve diferenças significativas entre os grupos. **(B)** Imagem representativa da resposta de plasmoblastos circulantes nas amostras de sangue total fresco do voluntário 7007, pré- e pós-vacinação. B, valor basal obtido na coleta pré vacinação. D, dias após vacinação.

Tabela 6. Frequência (%) de plasmoblastos ($CD19^+ CD3^+ CD14^- CD20^{low} CD27^{high} CD38^{high}$) em voluntários vacinados com a formulação 17DD (n=7) nos dias B, D7, D14 e D28, pré e pós-vacinação.

ID	B	D7	D14	D28
FA7001	1.27	1.44	1.14	1.16
FA7002	0.53	0.65	0.96	0.29
FA7003	0.31	0.49	0.58	0.41
FA7004	0.21	0.35	0.28	0.28

FA7005	0.45	0.65	1.95	0.15
FA7006	2.73	2.66	1.38	0.87
FA7007	0.27	0.85	6.2	0.91

ID: Número de identificação do voluntário. B: valor basal da coleta pré-vacinação; D: dias pós-vacina.

Tabela 7. Análise estatística (teste não paramétrico de Mann-Whitney) da frequência (%) de plasmoblastos detectada no grupo de voluntários vacinados com 17DD (n=7), pré e pós-vacinação.

	Dias de seguimento			
	B (n = 7)	D7 (n = 7)	D14 (n = 7)	D28 (n = 7)
Mediana (IQR)	0,45 (0,27-1,27)	0,65 (0,47-1,44)	1,14 (0,54-1,95)	0,41 (0,28-0,91)
Valor de P				
vs. B	-	0,259	0,165	0,805
vs. D7	0,259	-	0,535	0,318
vs. D14	0,165	0,535	-	0,073
vs. D28	0,805	0,318	0,073	-

IQR: amplitude do intervalo interquartil; B: valor basal da coleta pré-vacinação; D: dias pós-vacina.

Apesar de observada expansão de plasmoblastos, por exemplo, do voluntário 7007, 20 vezes maior do que a frequência pré vacinação, tipo de expansão já descrita em maiores níveis após a vacinação com a vacina tetravalente Butantan-DV em um indivíduo previamente exposto naturalmente ao vírus da dengue (MAGNANI, et al., 2017), o conjunto das frequências obtidas pelos voluntários não se mostrou estatisticamente significante. Outras vacinas já se mostraram eficazes em promover a expansão de plasmoblastos em períodos de tempo semelhantes, 7 a 12 dias após a imunização, como TIV e LAIV, vacinas contra influenza (SASAKI et al., 2007).

4.1.2 Indivíduos com Infecção Natural

O diagnóstico de infecção natural pelo YFV foi confirmada pelo método de PCR, ou por métodos de identificação de RNA em tecido para aqueles indivíduos em que a PCR para o YFV foi indetectável (KALLÁS et al., 2019). Os pacientes portadores da febre amarela desta coorte foram separados em grupos com base no desfecho clínico, sendo eles: alta hospitalar

(sobreviventes) e óbitos. Durante a infecção natural, um aumento significativo na frequência de plasmoblastos circulantes foi observada em ambos os grupos a partir do 4º dia após início dos sintomas em comparação às amostras de indivíduos saudáveis, não infectados pelo YFV (grupo CTR, controle). Nos indivíduos sobreviventes, a frequência de plasmoblastos estava significativamente aumentada no 4º dia após início de sintomas em comparação ao 30º, quando se detectou frequências de plasmoblastos abaixo da mediana do grupo CTR (Figura 9). O ápice da expansão de plasmoblastos circulantes foi detectado no 6º dia após início de sintomas para os dois desfechos, sendo significativamente aumentada em ambos os grupos quando comparado ao grupo CTR. No grupo de indivíduos sobreviventes, a frequência de plasmoblastos detectada no 6º dia também foi significativamente maior se comparada ao 30º após início de sintomas. Com relação às frequências de plasmoblastos detectadas no 6º dia após início de sintomas, o grupo com desfecho de óbito (mediana, 55,7%) atingiu valores significativamente maiores comparados àqueles observados no grupo sobrevivente (mediana, 23,4%). A diferença significativa entre os dois desfechos também foi observada no 10º dia, sendo a mediana maior do grupo que foi a óbito. Nos dois grupos, a frequência aumentada de plasmoblastos circulantes foi observada até o 14º após início de sintomas, momento em que essas frequências ainda apresentaram diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo CTR. No grupo de sobreviventes, a frequência de plasmoblastos detectada no 14º dia após início de sintomas também se apresentou significativamente aumentada em comparação àquela observada no 30º dia. As frequências individuais estão apresentadas na Tabela 8 e 9, e todas as comparações estatísticas realizadas entre os grupos e entre os dias após início de sintomas estão apresentadas na Tabela 10.

Figura 9. Cinética de expansão de plasmoblastos circulantes nos indivíduos com infecção natural pelo YFV (n=70)

NOTA: Os grupos foram separados baseando-se no desfecho clínico, sendo eles: Sobreviventes (alta hospitalar) e Óbitos. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. CTR; #p < 0,01, ##p < 0,001 vs. D30 sobrevivente; &p < 0,01 vs. D6 sobrevivente; &#p < 0,01 vs. D6 óbito; e. **p < 0,01 vs. D10 óbito. D, dias após início de sintomas. CTR (grupo controle não infectado pelo YFV), indivíduos saudáveis em um único momento.

Tabela 8. Frequência (%) de plasmoblastos (CD19⁺ CD3⁻ CD14⁻ CD20^{low} CD27^{high} CD38^{high}) nos indivíduos sobreviventes com infecção natural pelo YFV (n=44) nos dias 4, 6, 10, 12, 14 e 30 após início de sintomas.

ID	Frequência de Plasmoblastos (%)					
	D4	D6	D10	D12	D14	D30
1002	-	75.7	-	9.93	33.3	1.58
1003	15.1	-	2.31	9.58	27.2	-
1004	-	23.3	-	4.47	9.19	4.4
1006	-	-	-	-	17	50.7
1007	5.74	4.17	-	14.5	-	-
1008	-	-	-	20.8	-	14.1
1009	3.41	9.73	-	-	-	-
1010	4.88	-	5.84	6.93	7.03	3.41
1011	-	-	-	8.07	43	-

1012	-	-	2.01	22.1	-	-
1014	-	19	-	4.41	3.27	-
1015	13	-	-	29		
1016	-	7.05	-	32.1	12.2	-
1017	-	-	16.6	-	18.4	2.41
1018	-	-	-	-	18.2	0.69
1019	0.34	32.1	25.6	20.5	-	-
1022	15.9	35.3	8.22	12.2	-	-
1023	-	69.8	62.3	-	4.73	1.27
1027	-	46.5	-	10.2	7.35	6.62
1031	-	36	-	-	-	-
1032	-	28.4	-	-	11.3	4.78
1033	-	-	-	17.4	12.2	0.27
1034	-	32.3	19.3	-	-	-
1039	-	38.4	-	-	-	-
1041	-	-	7.06	-	6.45	-
1045	12.1	22.1	13	20.9		
1046	-	-	46	47.2	25.8	-
1047	-	23.4	14	1.9	-	-
1049	-	20.9	5.91	-	-	4.53
1050	-	-	2.82	-	-	-
1051	-	55.7	36.3	26.8	14.2	-
1052	-	0.94	0.13	0.66	-	-
1053	-	9.55	42	-	37.9	-
1054	-	-	52.8	39	29.8	12.1
1057	-	-	18.1	-	-	-
1059	-	-	-	26.1	11.9	-
1068	-	6.76	-	-	23.6	1.14
1071	-	-	-	25.2	14.2	4.42
1072	-	-	-	-	42.8	10.9
1073	-	-	-	-	19	-
1076	-	-	14.9	22.6	-	-
1080	-	-	21.2	19.1	32.5	6.72
1084	-	7.15	3.38	13.4	9.72	2.12

1085	-	-	-	-	14.5	-
------	---	---	---	---	------	---

ID – Número de identificação do voluntário. D – dias após início de sintomas da infecção.

Tabela 9. Frequência (%) de plasmoblastos (CD19⁺ CD3⁻ CD14⁻ CD20^{-/low} CD27^{high} CD38^{high}) nos indivíduos com infecção natural pelo YFV que foram a óbito (n=26) nos dias 4, 6, 10, 12, 14 e 30 após início de sintomas.

ID	Frequência de Plasmoblastos (%)					
	D4	D6	D10	D12	D14	D30
1005	8.57	-	-	-	-	-
1020	0.51	-	-	-	-	-
1024	37.9	-	-	-	-	-
1026	-	68	-	11.5	-	-
1028	-	87.6	-	-	-	-
1029	18.5	-	-	-	-	-
1030	3.23	26.7	-	-	-	-
1036	-	55.7	-	-	-	-
1037	-	-	-	21.7	-	-
1042	-	14.3	-	14.3	30	-
1043	-	59.8	-	-	-	-
1055	32.8	-	-	-	-	-
1061	-	-	-	-	14.7	-
1063	-	66.1	54.5	-	-	-
1065	-	55.6	58.1	-	19.3	-
1066	-	-	53.1	-	-	-
1069	-	33.9	-	-	-	-
1070	-	61.7	20	11.3	-	-
1074	48.4	40.8	-	40.4	33.1	-
1075	-	89.5	-	-	-	-
1078	-	-	-	-	21.5	-
1079	-	65.5	49.2	-	-	-
1081	-	23.2	-	-	-	-
1082	-	-	14.5	20.1	-	-
1083	-	-	-	16.6	27.7	17
1086	9.14	11.3	35.4	-	-	-

ID – Número de identificação do voluntário. D – dias após início de sintomas da infecção.

Tabela 10. Análise estatística (teste não paramétrico de Mann-Whitney) realizada para os indivíduos com infecção natural pelo YFV separados em subgrupos conforme desfecho (sobreviventes e óbitos).

	Comparação	Significância	Valor de P	Mediana (IQR)
D4 sobreviventes (n= 8)	vs. D6 sobreviventes	**	0,008	8,9 (3,8 – 14,6)
	vs. D10 sobreviventes	ns	0,173	
	vs. D12 sobreviventes	*	0,039	
	vs. D14 sobreviventes	*	0,029	
	vs. D30 sobreviventes	ns	0,155	
	vs. D4 óbitos	ns	0,328	
	vs. D6 óbitos	***	<0,001	
	vs. D10 óbitos	**	0,001	
	vs. D12 óbitos	*	0,040	
	vs. D14 óbitos	**	0,003	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	*	0,010	
D6 sobreviventes (n=22)	vs. D10 sobreviventes	ns	0,108	23,4 (9,0 – 36,6)
	vs. D12 sobreviventes	ns	0,130	
	vs. D14 sobreviventes	ns	0,206	
	vs. D30 sobreviventes	***	<0,001	
	vs. D4 óbitos	ns	0,393	
	vs. D6 óbitos	**	0,006	
	vs. D10 óbitos	ns	0,122	
	vs. D12 óbitos	ns	0,500	
	vs. D14 óbitos	ns	0,935	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
D10 sobreviventes (n= 22)	vs. CTR	***	<0,001	14,5 (5,2 – 28,3)
	vs. D12 sobreviventes	ns	0,630	
	vs. D14 sobreviventes	ns	0,514	
	vs. D30 sobreviventes	**	0,006	
	vs. D4 óbitos	ns	0,872	
	vs. D6 óbitos	***	<0,001	
	vs. D10 óbitos	*	0,011	
	vs. D12 óbitos	ns	0,506	
	vs. D14 óbitos	ns	0,144	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
D12 sobreviventes (n= 26)	vs. CTR	***	<0,001	18,6 (9,2 – 25,4)
	vs. D14 sobreviventes	ns	0,870	
	vs. D30 sobreviventes	***	<0,001	
	vs. D4 óbitos	ns	0,921	
	vs. D6 óbitos	***	<0,001	
	vs. D10 óbitos	**	0,004	
	vs. D12 óbitos	ns	0,813	
	vs. D14 óbitos	ns	0,107	
D14 sobreviventes (n= 27)	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	14,5 (9,7 – 27,2)
	vs. CTR	***	<0,001	
	vs. D30 sobreviventes	***	<0,001	
	vs. D4 óbitos	ns	0,810	
	vs. D6 óbitos	***	<0,001	
	vs. D10 óbitos	**	0,002	
	vs. D12 óbitos	ns	0,715	
	vs. D14 óbitos	ns	0,106	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	***	<0,001	

D30 sobreviventes (n= 18)	vs. D4 óbitos	ns	0,080	
	vs. D6 óbitos	***	<0,001	
	vs. D10 óbitos	***	<0,001	
	vs. D12 óbitos	***	<0,001	4,4 (1,5 – 7,8)
	vs. D14 óbitos	***	<0,001	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	*	0,022	
D4 óbitos (n= 8)	vs. D6 óbitos	**	0,004	
	vs. D10 óbitos	*	0,029	
	vs. D12 óbitos	ns	0,613	13,8 (4,6 – 36,6)
	vs. D14 óbitos	ns	0,491	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	*	0,010	
D6 óbitos (n= 15)	vs. D10 óbitos	ns	0,237	
	vs. D12 óbitos	**	0,005	
	vs. D14 óbitos	*	0,035	55,7 (26,7 – 66,1)
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	***	<0,001	
D10 óbitos (n= 7)	vs. D12 óbitos	*	0,038	
	vs. D14 óbitos	ns	0,138	49,2 (20 – 54,5)
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	***	<0,001	
D12 óbitos (n= 7)	vs. D14 óbitos	ns	0,234	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	16,6 (11,5 – 21,7)
	vs. CTR	***	<0,001	
D14 óbitos (n= 6)	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	24,6 (18,2 – 30,8)
	vs. CTR	***	<0,001	
D30 óbitos (n= 1)	vs. CTR	n insuficiente	-	17 (17 – 17)
CTR (n= 8)		-	-	1,2 (0,8 – 2,8)

IQR – amplitude do interquartil; D – dias após vacinação; CTR – controle negativo, indivíduos não infectados; ns – não significativo.

A dinâmica da resposta de plasmoblastos observada nos indivíduos naturalmente infectados do nosso estudo se assemelha àquela observada em outras flavivirose, como dengue (PRIYAMVADA et al., 2016; WRAMMERT et al., 2012) e zika (RICCIARDI et al., 2017). Entretanto, vale ressaltar que a magnitude da expansão detectada em nossa coorte durante o ápice da resposta foi elevada (mediana, 23,4% para sobreviventes e 55,7% para óbitos),

com alguns casos atingindo uma frequência de plasmoblastos de mais de 80% dentro do total de células B CD19⁺. De fato, nossos achados corroboram com os relatos prévios de expansão de plasmoblastos após infecção ou imunização, que demonstraram que o pico de expansão é encontrado entre a primeira e segunda semanas após imunização (MILLER et al., 2008; MARTINS et al., 2007; BETHKE, 2011) ou após início dos sintomas durante a infecção natural (WRAMMERT et al., 2012; QUARESMA et al., 2013).

Durante a inclusão dos indivíduos naturalmente infectados foi relatado verbalmente a vacinação prévia com a formulação 17DD (Tabela 2). Com base nessa informação, os indivíduos infectados dos grupos sobreviventes e óbitos também foram categorizados com base no histórico de vacinação. A cinética de expansão de plasmoblastos foi semelhante àquela observada nas análises dos grupos sobreviventes e óbitos (Figura 9), independente do histórico de vacinação e o ápice de expansão também foi observado no 6º dia após início de sintomas em todas as condições (Figura 10A e B), sendo a frequência significativamente maior no grupo de óbitos. Da mesma forma, a frequência de plasmoblastos se manteve significativamente aumentada até o 14º dia em comparação ao grupo saudável não infectado (CTR) e aos valores detectados no 30º dia após início de sintomas. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos que relataram vacinação ou não, tanto para sobreviventes quanto para óbitos. Embora não significativo, foi observada que, nessa coorte, as medianas das frequências de plasmoblastos no 4º e entre o 10º e 14º dias após início de sintomas foram menores no grupo que relatou a vacinação, sendo observado uma mediana de frequência maior apenas no 6º dia quando comparado com o grupo que não relatou vacinação (Figura 10A e B). Todas as análises estatísticas realizadas na comparação dos grupos categorizados conforme histórico de vacinação estão mostradas nas Tabelas 11 e 12.

Figura 10. Cinética de expansão de plasmoblastos circulantes nos indivíduos com infecção natural pelo YFV categorizados por histórico de vacinação

NOTA: **(A)** Frequência de plasmoblastos (%) dentro da população $CD19^+$ após o início de sintomas nos voluntários com infecção natural pelo YFV que declararam não possuir vacinação prévia contra a febre amarela (17DD), categorizados conforme desfecho (sobreviventes e óbitos). **(B)** Frequência de plasmoblastos (%) dentro da população $CD19^+$ após o início de sintomas nos voluntários com infecção natural pelo YFV que declararam possuir vacinação prévia contra a febre amarela (17DD), categorizados conforme desfecho (sobreviventes e óbitos). **(C)** Imagem representativa da resposta de plasmoblastos circulantes nas amostras de sangue total fresco do paciente 1002, sobrevivente não vacinado, de acordo com o dia de sintoma. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. CTR; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. D30 sobrevivente; e §§ $p < 0,01$ vs. D6 óbito. D, dias após início de sintomas. CTR (grupo controle não infectado pelo YFV), indivíduos saudáveis em um único momento.

Tabela 11. Análise estatística (teste não paramétrico de Mann-Whitney) realizada para os indivíduos com infecção natural pelo YFV que afirmaram não terem vacina prévia contra febre amarela (17DD) e categorizados em grupos conforme o desfecho clínico: sobreviventes e óbitos.

	Comparação	Significância	Valor de P	Mediana (IQR)
D4 sobreviventes (n= 4)	vs. D6 sobreviventes	ns	0,170	12,6 (5,6 – 12,6)
	vs. D10 sobreviventes	ns	0,286	
	vs. D12 sobreviventes	ns	0,120	
	vs. D14 sobreviventes	ns	0,128	
	vs. D30 sobreviventes	ns	0,128	
	vs. D4 óbitos	ns	0,762	
	vs. D6 óbitos	**	0,008	
	vs. D10 óbitos	*	0,012	
	vs. D12 óbitos	ns	0,352	
	vs. D14 óbitos	*	0,032	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	***	0,004	
D6 sobreviventes (n= 12)	vs. D10 sobreviventes	ns	0,347	21,5 (9,6 – 53,4)
	vs. D12 sobreviventes	ns	0,671	
	vs. D14 sobreviventes	ns	0,449	
	vs. D30 sobreviventes	***	<0,001	
	vs. D4 óbitos	ns	0,151	
	vs. D6 óbitos	*	0,048	
	vs. D10 óbitos	ns	0,340	
	vs. D12 óbitos	ns	0,437	
	vs. D14 óbitos	ns	>0,999	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	***	<0,001	

D10 sobrevivientes (n= 14)	vs. D12 sobrevivientes	ns	0,860	17,4 (5,3 – 43)
	vs. D14 sobrevivientes	ns	0,981	
	vs. D30 sobrevivientes	**	0,008	
	vs. D4 óbitos	ns	0,312	
	vs. D6 óbitos	**	0,005	
	vs. D10 óbitos	ns	0,079	
	vs. D12 óbitos	ns	0,672	
	vs. D14 óbitos	ns	0,687	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
D12 sobrevivientes (n= 12)	vs. CTR	***	<0,001	20,9 (10,1 – 26,5)
	vs. D14 sobrevivientes	ns	0,983	
	vs. D30 sobrevivientes	***	<0,001	
	vs. D4 óbitos	ns	0,256	
	vs. D6 óbitos	***	<0,001	
	vs. D10 óbitos	*	0,019	
	vs. D12 óbitos	ns	0,392	
	vs. D14 óbitos	ns	0,543	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
D14 sobrevivientes (n= 22)	vs. CTR	***	<0,001	18,3 (11,8 – 30,5)
	vs. D30 sobrevivientes	***	<0,001	
	vs. D4 óbitos	ns	0,219	
	vs. D6 óbitos	***	<0,001	
	vs. D10 óbitos	**	0,007	
	vs. D12 óbitos	ns	0,468	
	vs. D14 óbitos	ns	0,441	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	***	<0,001	
D30 sobrevivientes (n= 15)	vs. D4 óbitos	ns	0,424	4,5 (1,6 – 10,9)
	vs. D6 óbitos	***	<0,001	
	vs. D10 óbitos	***	<0,001	
	vs. D12 óbitos	**	0,005	
	vs. D14 óbitos	**	0,002	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	*	0,016	
D4 óbitos (n= 6)	vs. D6 óbitos	**	0,005	8,9 (2,6 – 34,1)
	vs. D10 óbitos	*	0,022	
	vs. D12 óbitos	ns	0,394	
	vs. D14 óbitos	ns	0,429	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	*	0,043	
D6 óbitos (n= 14)	vs. D10 óbitos	ns	0,197	57,8 (25,8 – 66,6)
	vs. D12 óbitos	**	0,004	
	vs. D14 óbitos	ns	0,056	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	***	<0,001	
D10 óbitos (n= 7)	vs. D12 óbitos	*	0,022	49,2 (20 – 54,5)
	vs. D14 óbitos	ns	0,149	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	***	<0,001	

D12 óbitos (n= 6)	vs. D14 óbitos	ns	0,126	
	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	15,5 (11,5 – 20,5)
	vs. CTR	***	<0,001	
D14 óbitos (n= 5)	vs. D30 óbitos	n insuficiente	-	21,5 (17 – 28,9)
	vs. CTR	**	0,002	
D30 óbitos (n= 1)	vs. CTR	n insuficiente	-	17 (17 – 17)
CTR (n= 8)		-	-	1,2 (0,8 – 2,8)

IQR – amplitude do interquartil; D – dias após vacinação; CTR – controle negativo, indivíduos não infectados; ns – não significativo.

Tabela 12. Análise estatística (teste não paramétrico de Mann-Whitney) realizada para os indivíduos com infecção natural pelo YFV que afirmaram terem vacina prévia contra febre amarela (17DD) e separados em subgrupos de desfecho, sendo eles, sobrevivente e óbito.

	Comparação	Significância	Valor de P	Mediana (IQR)
D4 sobreviventes (n= 4)	vs. D6 sobreviventes	ns	0,076	
	vs. D10 sobreviventes	ns	0,461	
	vs. D12 sobreviventes	ns	0,414	
	vs. D14 sobreviventes	ns	0,254	
	vs. D30 sobreviventes	ns	0,229	
	vs. D4 óbitos	ns	0,133	5,3 (1,5 – 13,4)
	vs. D6 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. D12 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. D14 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	ns	0,214	
D6 sobreviventes (n= 10)	vs. D10 sobreviventes	ns	0,083	
	vs. D12 sobreviventes	ns	0,068	
	vs. D14 sobreviventes	ns	0,155	
	vs. D30 sobreviventes	*	0,049	
	vs. D4 óbitos	ns	0,606	27,8 (6,3 – 35,5)
	vs. D6 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. D12 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. D14 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	***	<0,001	

D10 sobreviviente (n= 8)	vs. D12 sobrevivientes	ns	0,815	
	vs. D14 sobrevivientes	ns	0,913	
	vs. D30 sobrevivientes	ns	0,194	
	vs. D4 óbitos	ns	0,178	7,6 (3,6 – 18)
	vs. D6 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. D12 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. D14 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	*	0,021	
D12 sobrevivientes (n= 9)	vs. D14 sobrevivientes	ns	0,797	
	vs. D30 sobrevivientes	ns	0,100	
	vs. D4 óbitos	ns	0,145	
	vs. D6 óbitos	n insuficiente	-	12,2 (3,2 – 19)
	vs. D12 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. D14 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	*	0,015	
D14 sobrevivientes (n= 5)	vs. D30 sobrevivientes	*	0,036	
	vs. D4 óbitos	ns	0,095	
	vs. D6 óbitos	n insuficiente	-	9,2 (6,7 – 12,2)
	vs. D12 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. D14 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	**	0,002	
D30 sobrevivientes (n= 3)	vs. D4 óbitos	ns	0,200	
	vs. D6 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. D12 óbitos	n insuficiente	-	3,4 (0,3 – 4,4)
	vs. D14 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	ns	0,497	
D4 óbitos (n= 2)	vs. D6 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. D12 óbitos	n insuficiente	-	33,5 (18,5 – 48,4)
	vs. D14 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	*	0,044	
D6 óbitos (n= 1)	vs. D12 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. D14 óbitos	n insuficiente	-	40,8 (40,8 – 40,8)
	vs. CTR	n insuficiente	-	
D12 óbitos (n= 1)	vs. D14 óbitos	n insuficiente	-	
	vs. CTR	n insuficiente	-	40,4 (40,4 – 40,4)

D14 óbitos (n= 1)	vs. CTR	n insuficiente	-	33,1 (33,1 – 33,1)
	CTR (n= 8)	-	-	1,2 (0,8 – 2,8)

IQR – amplitude do interquartil; D – dias após vacinação; CTR – controle negativo, indivíduos não infectados; ns – não significativo.

4.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DAS REGIÕES V_H E V_L DA IGS DERIVADAS DE PLASMOBLASTOS INDIVIDUAIS

Baseado em dados da literatura sobre expansão de plasmoblastos após vacinação (QUEREC et al., 2009; BETHKE, 2011), o isolamento dessas células no grupo de voluntários vacinados foi realizado nos dias 7 e 14 após a vacinação. Para este grupo, foram obtidas duas placas de 96 poços para cada dia de coleta de cada voluntário totalizando 28 placas contendo 88 plasmoblastos únicos (mantendo-se nos poços da primeira coluna da placa apenas tampão para controle negativo da PCR).

No grupo de indivíduos infectados, o isolamento de plasmoblastos foi realizado nas amostras que apresentaram frequência elevada dessas células dentro da população de células B total, levando em consideração elevações de frequência como as observadas para outras flavivirose, como dengue (PRIYAMVADA et al., 2016) e zika (RICCIARDI et al., 2017). Assim, nesse grupo, o isolamento foi realizado principalmente nas amostras coletadas no 6º dia após início de sintomas, embora algumas amostras tenham sido submetidas ao procedimento nos 4º, 12º e 14º dias devido à detecção da alta frequência dessas células. Foram obtidas um total de 22 placas de 96 poços contendo 88 plasmoblastos únicos isolados derivados de amostras dos doadores 1002 (5 placas: 3 placas referentes a D6 e 2 placas a D14), 1003 (2 placas referentes a D4), 1004 (2 placas referentes a D6), 1005 (1 placa referente a D4), 1008 (2 placas referentes a D12), 1014 (2 placas referentes a D6), 1023 (3 placas referentes a D6), 1026 (2 placas referentes a D6) e 1028 (3 placas referentes a D6).

Dentre as placas de plasmoblastos isolados, algumas delas foram priorizadas para a realização de síntese de cDNA e *nested*-PCR dos

segmentos V_H e V_L , baseadas na frequência de plasmoblastos obtidas após imunofenotipagem de sangue total, foram selecionadas aquelas derivadas de amostras que apresentaram os maiores valores percentuais de plasmoblastos circulantes dentro da população de células B totais. No caso do grupo de indivíduos infectados, a seleção também considerou os parâmetros clínicos, optando-se pelas amostras derivadas de pacientes que tiveram a alta hospitalar como desfecho. Dessa forma, foram realizadas as amplificações para as regiões V_H e V_L de placas dos voluntários vacinados 7001 (1 placa), 7002 (1 placa), 7003 (4 placas), 7005 (1 placa), 7006 (4 placas) e 7007 (1 placa) e dos indivíduos infectados 1002 (2 placas), 1008 (1 placa), 1014 (1 placa), 1023 (1 placa) e 1028 (1 placa). Os fragmentos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 2% (Figura 11).

Figura 11. Visualização dos fragmentos amplificados (400-450 kb) das regiões variáveis da cadeia pesada de Ig após eletroforese em gel de agarose 2%

NOTA: **(A)** Representação esquemática do conteúdo da placa de PCR de 96 poços onde foi realizada a amplificação da região V_H de células isoladas individualmente, sendo a primeira coluna da placa feita para controle negativo. Os retângulos verdes correspondem aos poços que contém fragmentos amplificados. **(B)** Foto do gel de agarose após eletroforese dos produtos das reações de PCR realizadas nas três primeiras linhas A, B, C e D da placa do voluntário vacinado 7006, 7 dias após vacinação. Na figura destacam-se as bandas correspondentes aos fragmentos amplificados da região V_H da Ig. M, marcador padrão de peso molecular de 1 kb (Invitrogen, Life Technologies).

Um total de doze placas de seis voluntários vacinados foram submetidas às PCRs e, dessas, 326 pares IgV_H/V_L foram amplificados (rendimento das amplificações de 31%) sendo 233 IgV_H/V_{LKappa} (71,5%) e 93 $IgV_H/V_{LLambda}$ (28,5%) (Tabela 13). No grupo de indivíduos infectados, foram submetidas às

PCRs seis placas de cinco indivíduos diferentes, das quais foi obtido um total de 342 pares IgV_H/V_L amplificados (rendimento das amplificações de 65%) sendo 183 IgV_H/V_{LKappa} (53,5%) e 159 $IgV_H/V_{LLambda}$ (46,5%) (Tabela 14). Em todas as amplificações realizadas para os dois grupos apenas um tipo de cadeia leve (IgV_{LKappa} ou $IgV_{LLambda}$) foi encontrada para cada IgV_H amplificada, sugerindo a pureza das células únicas isoladas obtidas.

Tabela 13. Resumo dos procedimentos de amplificação de Ig de célula única realizados em placas de 96 poços contendo plasmoblastos únicos obtidas de seis voluntários vacinados com a formulação 17DD.

Voluntários	Dias pós-vacinação	Número da placa	Rendimento de amplificações			
			IgV_H/V_{LKappa}	$IgV_H/V_{LLambda}$	Total	
7001	D7	P1	10	7	17	19%
7002	D7	P1	13	5	18	20%
7003	D7	P1	13	14	27	31%
7003	D7	P2	27	21	48	54%
7003	D14	P1	37	12	49	56%
7003	D14	P2	39	6	45	51%
7005	D7	P1	10	5	15	17%
7006	D7	P1	20	7	27	31%
7006	D7	P2	17	2	19	22%
7006	D14	P1	9	0	9	10%
7006	D14	P2	10	3	13	15%
7007	D14	P1	28	11	39	44%
Total			233	93	326	31%

Tabela 14. Resumo dos procedimentos de amplificação de Ig de célula única realizada em amostras de placas de 96 poços contendo plasmoblastos únicos obtidas de cinco indivíduos infectados com o YFV selvagem.

Pacientes	Dias após início de sintomas	Número da placa	Rendimento de Amplificações			
			IgV_H/V_{LKappa}	$IgV_H/V_{LLambda}$	Total	
1002	D6	P1	28	24	52	59%
1002	D14	P1	29	34	63	72%
1008	D12	P1	32	31	63	72%
1014	D6	P1	38	18	56	64%

1023	D6	P1	38	27	65	74%
1028	D6	P1	18	25	43	49%
Total			183	159	342	65%

4.3 SEQUENCIAMENTO

Foram sequenciados os pares de IgV_H/V_L amplificados de dois voluntários do grupo de vacinados (7003 e 7006, dos dias 7 e 14 pós-vacinação) e de cinco pacientes do grupo de infecção natural (1002, 1014, 1023 e 1028, coletadas em D6; 1008, coletada em D12; e 1002, coletada em D14). A análise demonstrou que todas as sequências pertenciam à região variável de imunoglobulinas e permitiu a identificação das famílias e do nível de identidade com sequências germinativas dos rearranjos de genes V(D)J, níveis de hipermutações somáticas (SHM) como também o comprimento em aminoácidos da região CDR3, localizada nas regiões variáveis das cadeias leve e pesada da imunoglobulina, importante para o reconhecimento específico de antígenos. Os dados detalhados das análises de cada sequência estão apresentados nos Apêndices A e B.

Das amostras sequenciadas e analisadas, foram encontradas diferenças nas famílias dos segmentos V(D)J e no comprimento das sequências de CDR3, indicando que não houve viés de seleção clonal resultante da estratégia de isolamento. Com relação à identidade dos segmentos V e J das cadeias V_H e V_L, foi encontrado um alto grau de identidade com a sequência germinativa nos dois grupos de amostras, entretanto, o grau de identidade do segmento V das cadeias pesadas e leves foi significativamente maior para o grupo naturalmente infectado ($p < 0,001$), e, semelhante àquele observado nas sequências de cadeia variável de Ig derivadas de indivíduos infectados com H1N1 (>80%) (WRAMMERT et al., 2011). O comprimento médio de CDR3 nas sequências IgV_H e IgV_L de vacinados e infectados foi bastante semelhante ($p = 0,331$ e $p = 0,754$, respectivamente), mas o nível de SHM foi significativamente mais elevado nas sequências de imunoglobulina derivadas dos indivíduos vacinados, tanto para as regiões IgV_H ($p < 0,001$) quanto para IgV_L ($p < 0,001$). De maneira interessante, em um indivíduo com H1N1 severa foi observado um

nível baixo de SHM, o que foi relacionado com o surgimento de uma resposta imune primária contra o vírus influenza (WRAMMERT et al., 2011). Os valores de p referentes as comparações estatísticas realizadas para as médias de valores dos parâmetros avaliados estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Resumo da caracterização dos fragmentos das regiões variáveis obtidas no isolamento de plasmoblastos individuais derivados de voluntários vacinados com a formulação 17DD e indivíduos com infecção natural pelo YFV.

Região da Ig	Vacinados	Infectados	Valor de p*
IgV_H			
Média de identidade do segmento V (%)	93,1	95,8	<0,001
Média de identidade do segmento J (%)	86,0	85,4	0,514
Média de SHM (aa)	12,2	7,2	<0,001
Média de Comprimento CDR3 (aa)	14,8	15,4	0,331
IgV_L			
Média de identidade do segmento V (%)	93,6	96,4	<0,001
Média de Identidade do segmento J (%)	91,6	95,2	<0,001
Média de SHM (aa)	10,5	6,3	<0,001
Média de Comprimento CDR3 (aa)	9,8	9,8	0,754

*Os valores de p foram obtidos pela análise estatística utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney e são referentes a comparação em relação ao grupo de vacinados.

aa – aminoácidos

A análise geral de todas as sequências do segmento V da região variável de V_H nas amostras de voluntários vacinados analisadas mostrou uma alta frequência da família IgHV3 (71,1%), seguidas pelas famílias IgHV1 (13,2%), IgHV4 (8,3%) e IgHV5 (7,4%) (Figura 12A). A região variável da cadeia pesada difere dependendo da célula B que a produziu, mas é a mesma para todos os anticorpos originados do mesmo clone de célula B. A análise separada das famílias de Ig nas amostras coletadas no 7º dia pós-vacinação dos dois voluntários vacinados mostrou um padrão semelhante no tipo de famílias de IgHV observadas, diferindo, porém, na presença da família IgHV5, que foi detectada apenas no 14º dia na amostra do voluntário 7003, ao contrário do observado nas amostras do voluntário 7006. Nas amostras coletadas no 14º dia, a família IgHV5 foi detectada em proporções relevantes no conjunto de sequências da região IgV_H dos dois voluntários; na amostra do

voluntário 7006, em particular, a família IgHV5 foi identificada em 2 das 5 (40%) sequências da região IgV_H que puderam ser caracterizadas (Figura 12B). Apesar do número discreto de sequências de Ig analisadas, é possível especular que essa diferença na distribuição de famílias IgHV tenha relação não apenas com a variabilidade entre indivíduos mas também esteja associada com o histórico de infecção natural pelo YFV relatado pelo voluntário 7006, fato que poderia influenciar na formação de repertórios de anticorpos distintos pela exposição prévia à antígeno selvagem.

A respeito das sequências dos indivíduos infectados 1002 (D6 e D14), 1008 D12, 1014 D6, 1023 D6 e 1028 D6, foi observada a presença de cinco famílias de V_H diferentes, sendo a de maior frequência a IgHV3 (59,5%), seguida de IgHV4 (19,5%), IgHV1 (13,9%), IgHV5 (6,1%) e IgHV6 (0,9%) (Figura 12A). Quando as amostras foram avaliadas individualmente, a maioria apresentou um padrão de distribuição das famílias IgHV semelhante àquele observado na análise geral, observando-se em alguns casos diferenças nas frequências (principalmente da família IgHV4, que difere em todos indivíduos quanto a proporção) e na presença da família IgHV6 (detectada apenas nas amostras do 6º dia dos indivíduos 1014 e 1023) e IgHV5 (ausente no conjunto de sequências IgV_H da amostra 1008 D12) (Figura 12C). De maneira semelhante, alta frequência de Ig contendo a família IgHV3 foi observada em indivíduos com infecção primária pelo DENV, sendo as Ig com família IgHV1 detectadas em maior proporção nos casos de dengue secundária (GODOY-LOZANO et al., 2016). Outros estudos também demonstraram alta frequência de famílias IgHV3 e IgHV1 no repertório de anticorpos de indivíduos com febre do Nilo ocidental (THROSBY et al., 2006; TSIORIS et al., 2015). TSIORIS e colaboradores (2015) relataram o isolamento de anticorpos neutralizantes em indivíduos naturalmente infectados pelo vírus da febre do Nilo ocidental, tanto em fase aguda como convalescente da doença e mostraram alta frequência das famílias IgHV3 e IgHV4 no repertório de anticorpos neutralizantes isolados de indivíduos com infecção aguda e convalescente.

Figura 12. Análise de frequência das famílias de IgHV da região variável da cadeia pesada das Igs derivadas de voluntários vacinados com a formulação 17DD e de indivíduos infectados pelo YFV

NOTA: **(A)** Análise comparativa das frequências de famílias IgHV identificadas nas amostras dos dois voluntários vacinados e nas amostras dos cinco indivíduos infectados pelo YFV selvagem. **(B)** Famílias de IgHV das sequências obtidas das amostras dos voluntários 7003 e 7006 coletadas nos dias 7 (D7) e 14 (D14) após vacinação. **(C)** Famílias de IgHV das sequências de Ig derivadas das amostras dos indivíduos 1002, 1008, 1014, 1023 e 1028 coletadas nos dias 6 (D6), 12 (D12) e 14 (D14) após o início dos sintomas, durante infecção pelo YFV selvagem.

A análise das sequências de cadeias leves (V_{LKappa} e $V_{LLambda}$) nas amostras dos dois voluntários vacinados revelou um número menor de sequências produtivas, principalmente do tipo $V_{LLambda}$ (Apêndice B). Particularmente nas amostras do voluntário 7006, foi possível identificar apenas duas sequências produtivas do tipo $V_{LLambda}$ (2 do total de 20 sequências de cadeia leve). Em contrapartida, na análise das sequências derivadas das amostras do voluntário 7003, o número de sequências produtivas do tipo $V_{LLambda}$ foi mais frequente (17 do total 27 sequências de cadeia leve) quando comparado ao número de sequências V_{LKappa} .

Considerando as sequências do tipo V_{LKappa} dos dois indivíduos vacinados, a família de genes predominante é a IgKV1 (39,3%), seguida por IgKV3 (35,7%), IgKV2 (14,3%) e IgKV4 (10,7%) (Figura 13A). A família IgKV1 observada em alta frequência nas amostras do voluntário 7006 coletadas no 7º e 14º dias pós-vacinação, foi detectada no conjunto de sequências derivadas do voluntário 7003, mas apenas nas Igs obtidas da amostra coletada no 14º dia pós-vacina (Figura 13B). Com relação às famílias identificadas nas sequências do tipo $V_{LLambda}$ derivadas das amostras do voluntário 7003 (D7 e D14), foram observadas as seguintes frequências: IgLV1 (47,3%), IgLV2 (42,1%), IgLV3 (5,3%) e IgVL6 (5,3%) (Figura 14A). Como comentado anteriormente, apenas 2 sequências produtivas do tipo $V_{LLambda}$ foram obtidas para o voluntário 7006 na amostra coletada no 7º dia pós-vacinação, ambas portadoras de segmento da família IgLV2 (Figura 14B).

No conjunto de sequências de cadeias leves (V_{LKappa} e $V_{LLambda}$) derivadas dos indivíduos infectados, também houve uma predominância de Ig de cadeias do tipo V_{LKappa} em comparação com a frequência observada de $V_{LLambda}$. Com relação às cadeias tipo V_{LKappa} , foram detectadas as mesmas famílias IgKV observadas no conjunto voluntários vacinados, com uma pequena diferença nas frequências observadas, sendo a IgKV1 (40,2%) a mais frequente, seguida de IgKV3 (35,9%), IgKV4 (14,5%) e IgKV2 (9,4%) (Figura 13A). Na maioria dos pacientes infectados, a análise individual dos dados de frequência das famílias IgK apresentou uma distribuição semelhante àquela observada na análise geral do grupo, exceto nos indivíduos 1014 e 1023, em que foi identificado maior número de sequências com família IgKV3 (45,5% e 58%), seguida das sequências com segmento IgKV1, que representaram cerca de 30% do total do repertório de Ig de cada um desses indivíduos (Figura 13C). As frequências de famílias IgK encontrada em indivíduos naturalmente infectados pelo vírus da febre do Nilo ocidental foi muito semelhante a encontrada em nossa coorte, as famílias em maiores proporções foram IgKV1 e IgKV3, tanto para indivíduos com infecções agudas quanto convalescentes (TSIORIS et al., 2015).

Considerando o conjunto de sequências do tipo $V_{LLambda}$ no grupo de indivíduos infectados, foram detectadas as seguintes frequências: IgLV3

(33,6%), IgLV1 (29%), IgLV2 (25,2%), IgLV6 (8,4%), IgLV7 (1,9%) e IgLV9 (1,9%) (Figura 14A). A distribuição de famílias IgLV observadas nesse estudo difere daquela relatada por TSIORIS e colaboradores (2015) no repertório de Igs derivadas de indivíduos com infecção aguda e convalescente causada pelo vírus da febre do Nilo ocidental, que identificaram as famílias IgLV1 e IgLV2 como mais frequentes. A distribuição de famílias IgLV verificada no grupo de infecção natural diverge daquelas observadas para cada um dos cinco indivíduos infectados, mantendo-se porém presente, em todas as amostras, as três famílias mais predominantemente identificadas na análise global do grupo: IgLV1, IgLV2 e IgLV3. A família IgLV9 foi detectada apenas nos conjuntos de sequências dos indivíduos 1023 e 1028 (6º dia após início de sintomas) em baixa frequências (9,09% e 4,35%, respectivamente). As sequências que apresentavam a família IgLV6 foram identificadas apenas nas amostras dos sujeitos 1002 (amostras dos 6º e 14º dias após início de sintomas) e 1028 (6º dia após início de sintomas), neste último representando 30,4% do total de sequências $V_{LLambda}$ analisadas (Figura 14C).

Figura 13. Análise de frequência das famílias de IgKV das sequências da região variável da cadeia leve do tipo kappa das Igs derivadas de voluntários vacinados com a formulação 17DD e de indivíduos infectados pelo YFV

NOTA: **(A)** Análise comparativa das frequências de famílias IgKV identificadas nas amostras dos voluntários vacinados e dos indivíduos infectados pelo YFV selvagem. **(B)** Famílias de IgKV das sequências obtidas em cada uma das amostras dos voluntários 7003 e 7006 nos dias 7 (D7) e 14 (D14) após vacinação. **(C)** Famílias de IgKV das sequências obtidas em cada uma das amostras dos indivíduos 1002, 1008, 1014, 1023 e 1028 nos dias 6 (D6), 12 (D12) e 14 (D14) após o início dos sintomas da infecção pelo YFV selvagem.

Figura 14. Análise de frequência das famílias de IgLV das sequências da região variável da cadeia leve do tipo lambda das Igs derivadas de voluntários vacinados com a formulação 17DD e de indivíduos infectados pelo YFV

NOTA: **(A)** Análise comparativa das frequências de famílias IgLV identificadas nas amostras dos voluntários vacinados e dos indivíduos infectados pelo YFV selvagem. **(B)** Famílias de IgLV das sequências obtidas em cada uma das amostras dos voluntários 7003 e 7006 nos dias 7 (D7) e 14 (D14) após vacinação. **(C)** Famílias de IgLV das sequências obtidas em cada uma das amostras dos indivíduos 1002, 1008, 1014, 1023 e 1028 nos dias 6 (D6), 12 (D12) e 14 (D14) após o início dos sintomas da infecção pelo YFV selvagem.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE IGG TOTAL

As sequências pares das regiões IgV_H e IgV_L derivadas dos indivíduos naturalmente infectados foram clonadas em plasmídeos contendo porção Fc recombinante (proveniente da espécie *Macaca mulatta*) e posteriormente expressas *in vitro*. As Igs recombinantes que puderam ser expressas foram avaliadas quanto às suas capacidades de ligação e neutralização da cepa vacinal 17D do vírus da febre amarela.

Após expressão *in vitro*, a concentração de IgG total foi mensurada por

meio da técnica de ELISA e os dados foram representados na Figura 15 e descritos na Tabela 16. Foram avaliados um total de 193 sobrenadantes, cada um representando a expressão de uma Ig distinta. Deste total, foi possível mensurar a concentração de 119 IgG (74 delas apresentaram valores inferiores ao limite de detecção da curva padrão e por isso não foram consideradas para análise). As concentrações obtidas variaram entre as amostras. Não foi observada uma associação da concentração de IgG com paciente, data de coleta da amostra ou mesmo frequência de plasmoblastos circulantes. O indivíduo 1002 em seu 6º dia após início de sintomas apresentou as menores concentrações de IgG total, já o indivíduo 1014, também em seu 6º dia, apresentou a maior mediana de concentração de imunoglobulina.

Figura 15. Concentração de IgG total das imunoglobulinas recombinantes (rhIgG)

NOTA: IgG derivadas das sequências de pares IgV_H/IgV_L derivados de plasmoblastos únicos obtidos de indivíduos naturalmente infectados pelo YFV selvagem nos 6º, 12º e 14º dias após início de sintomas. Os dados estão representados em ug/mL e as barras representam a mediana e seus respectivos intervalos interquartis.

Tabela 16. Concentração (ug/mL) total de imunoglobulinas recombinantes do tipo IgG contendo as sequências dos pares IgV_H/IgV_L derivados de indivíduos com infecção natural pelo YFV.

	1002 D6	1002 D14	1008 D12	1014 D6	1023 D6	1028 D6
1	2,96	4,37	-	57,79	-	-
2	19,08	28,57	46,7	42,46	8,46	-
3	2,69	14,2	-	-	39,03	-

4	1,47	0,32	-	-	67,97	-
5	9,92	17,13	37,9	111,86	20,11	3,7
6	11,84	-	55,8	24,21	-	-
7	11,41	16,3	11,38	59,61	-	-
8	-	9,8	4,91	-	-	30,31
9	-	-	69,2	-	-	4,2
10	-	-	16,94	87,11	-	5,37
11	-	18,22	-	28,56	31,1	-
12	16,37	-	-	-	-	-
13	-	7,15	43,19	30,59	-	-
14	14,18	10,22	-	-	15,7	-
15	4,76	13,85	-	-	26,18	-
16	-	16,85	42,32	-	35,01	41,44
17	2,78	16,38	31,86	52,59	-	44,17
18	-	12,54	0,57	-	9,81	16,19
19	-	3,28	-	17,76	-	-
20	-	27,95	27,59	40,71	31,74	-
21	2,44	13,95	21,7	-	10,83	-
22	-	11,55	11,26	-	18,49	13
23	1,78	14,59	-	65,64	13,97	48,01
24	-	1,45	21,88	54,09	-	-
25	-	-	12,03		107,82	-
26	3,52	15,27	12,04		51,58	-
27	-	16,36	-			30,32
28	-	15,78	27,94			
29	-	18,36				
30	0,93	15,4				
31	7,28	28,16				
32		23,36				
33	0,31	4,48				
34	10,45	25,45				
35	2,73	14,61				
36	-	7,32				
37	4,88	9,46				
38	1,37	9,39				
39		10,76				
40		24,16				
41		-				
42		11,58				

43	26,84
44	0,49
45	11,77
46	-
47	13,35
48	-
49	16,8
50	6,52

D – dias após início de sintomas da infecção.

4.5 ENSAIO DE LIGAÇÃO AO VÍRUS VACINAL YFV-17D

As imunoglobulinas recombinantes expressas *in vitro* foram avaliadas quanto a sua capacidade de reconhecer o vírus vacinal da febre amarela YFV-17D (Figura 16). Neste ensaio, foram utilizadas alíquotas do sobrenadante puro (sem diluições) contendo as imunoglobulinas recombinantes, conforme descritas na Tabela 16. A Tabela 17 mostra todos os valores de absorbância a 450 nm das imunoglobulinas testadas. Neste ensaio, foi verificado que a maioria das imunoglobulinas não reconheceu o vírus da cepa 17D. Apenas três delas mostraram ligação discreta ao vírus vacinal (valor da absorbância ~ 0,7 nm): **P1F07 H2 K1** (25,45 ug/ml), da amostra 1002 D14; **P1B06 H1 K2** (4,91 ug/ml), da amostra 1008 D12; e **P1E12 H3 K1** (54,09 ug/ml), da amostra 1014 D6. Considerando as imunoglobulinas com melhor desempenho no ensaio de ligação, foi observado uma capacidade de reconhecimento bastante modesta quando comparado, por exemplo, a anticorpos isolados de um indivíduo infectado com ZIKV, utilizando a mesma metodologia de isolamento de plasmoblastos e clonagem, os quais obtiveram reconhecimento da cepa ZIKV em concentrações 1 ug/ml (MAGNANI et al., 2017a).

Figura 16. ELISA qualitativo de ligação das imunoglobulinas recombinantes à cepa vacinal YFV-17D

NOTA: Os valores são médias de triplicatas de absorbância mensurada a 450 nm.

Tabela 17. Valores da média de três medições de absorvância a 450 nm das imunoglobulinas referentes aos pares de sequências clonadas dos indivíduos com infecção natural pelo YFV.

	1002 D6	1002 D14	1008 D12	1014 D6	1023 D6	1028 D6
1	0,006	0,167	-	0,116	-	-
2	0,241	0,093	0,179	0,064	0,006	-
3	0,015	0,036	-	-	0,241	-
4	0,010	0,008	-	-	0,015	-
5	0,030	0,209	0,046	0,039	0,010	0,071
6	0,041	-	0,070	0,202	-	-
7	0,050	0,196	0,059	0,081	-	-
8	-	0,016	0,666	-	-	0,156
9	-	-	0,167	-	-	0,066
10	-	-	0,446	0,083	-	0,066
11	-	0,001	-	0,131	0,030	-
12	0,061	-	-	-	-	-
13	-	0,437	0,032	0,250	-	-
14	0,139	-0,006	-	-	0,041	-
15	0,008	0,277	-	-	0,050	-
16	-	0,000	0,023	-	0,061	0,109
17	0,032	0,356	0,054	0,206	-	0,065
18	-	0,005	0,016	-	0,139	0,100
19	-	-0,011	-	0,210	-	-
20	-	0,008	0,022	0,082	0,008	-
21	0,015	-0,006	0,043	-	0,032	-
22	-	0,419	0,038	-	0,015	0,154
23	0,006	-0,002	-	0,076	0,006	0,056
24	-	0,002	0,023	0,784	-	-
25	-	-	0,082		0,015	-
26	0,015	0,007	0,400		0,004	-
27	-	0,014	-			-
28	-	0,001	0,086			
29	-	0,014				
30	0,004	0,240				
31	0,016	0,156				
32	-	0,212				
33	0,003	-0,001				
34	0,110	0,744				
35	0,009	0,213				
36	-	0,074				

37	0,075	0,102
38	0,022	0,028
39		0,025
40		0,080
41		-
42		0,096
43		0,004
44		0,018
45		0,095
46		-
47		0,003
48		-
49		0,020
50		0,057

D – dias após início de sintomas da infecção.

4.6 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO *IN VITRO*

A avaliação da capacidade de neutralização do vírus vacinal YFV-17D *in vitro* foi realizada nas imunoglobulinas recombinantes derivadas das amostras dos indivíduos 1002 e 1028. Essa seleção foi baseada nos resultados da respostas de plasmoblastos: as amostras apresentaram frequências de plasmoblastos circulantes significativamente elevadas dentro da população total de células B no momento da coleta, sendo 75,7% e 87,6%, respectivamente.

As imunoglobulinas foram primeiramente testadas quanto a sua capacidade de neutralização na concentração do sobrenadante puro, determinada com o ELISA de IgG total (valores mostrados na Tabela 16). Nessa condição, a capacidade de neutralização da cepa vacinal foi nula ou baixa para a maioria das imunoglobulinas testadas (Figura 17 e Tabela 18). Apenas oito delas apresentaram uma capacidade de neutralização acima de 50%: **P1A07 H2 K1** (19,06 µg/ml) e **P1F08 H1 K3** (14,18 µg/ml), da amostra 1002 D6; e **P1A04 H5 L2** (4,37 µg/ml), **P1D04 H2 K1** (3,28 µg/ml), **P1F07 H2 K1** (25,45 µg/ml), **P1F10 H1 K1** (7,32 µg/ml), **P1H02 H1 K1** (26,84 µg/ml), e **P1H03 H1 K2** (11,77 µg/ml), da amostra 1002 D14.

Figura 17. Porcentagem de neutralização das imunoglobulinas em sua concentração do sobrenadante puro contra a cepa YFV-17D

Tabela 18. Porcentagem de neutralização das imunoglobulinas em sua concentração do sobrenadante puro contra a cepa YFV-17D. Os valores obtidos correspondem à média de três contagens de focos de infecção.

	1002 D6	1002 D14	1028 D6
1	0	53,14	-
2	95,3	15,87	-
3	9,1	37,17	-
4	0	14,8	-
5	25,4	27,58	0
6	0	-	-
7	0	39,3	-
8	-	33,97	14,91
9	-	-	15,92
10	-	-	11,91
11	-	44,62	-
12	3,3	-	-

13	-	11,61	-
14	66,2	18	-
15	10,3	35,04	-
16	-	29,71	28,93
17	41,7	16,93	11,91
18	-	26,52	38,94
19	-	64,86	-
20	-	22,26	-
21	13,8	27,58	-
22	-	35,04	8,91
23	30,1	0	8,91
24	-	13,74	-
25	-	-	-
26	12,6	31,84	-
27	-	14,8	-
28	-	24,39	
29	-	16,93	
30	3,3	32,91	
31	21,9	22,26	
32	-	14,8	
33	20,7	42,49	
34	28,9	52,08	
35	28,9	49,95	
36	-	60,6	
37	18,4	46,75	
38	19,6	9,48	
39		46,75	
40		35,04	
41		-	
42		35,04	
43		43,56	
44		65,92	
45		59,53	
46		-	
47		23,32	
48		-	
49		35,04	
50		32,91	

D – dias após início de sintomas da infecção.

Um segundo ensaio de neutralização foi realizado com as oito imunoglobulinas que apresentaram capacidade de neutralizar ao menos 50% da cepa YFV-17D em sua concentração total do sobrenadante puro. Para este ensaio, foi realizada uma diluição seriada, para verificar a real capacidade desses anticorpos em neutralizar o vírus *in vitro*. Como controle negativo foi utilizado uma imunoglobulina específica anti-SIV (SIV, do inglês, *Simian Immunodeficiency Virus*), a qual é sabida não possuir neutralização para o vírus da febre amarela. Como mostrado na Figura 18, as imunoglobulinas testadas não apresentaram capacidade de neutralizar o YFV-17D *in vitro* nas diluições utilizadas, apesar de terem apresentado certo nível de neutralização quando testado o sobrenadante puro (Figura 17). Um estudo semelhante testou 12 anticorpos isolados de indivíduos infectados com o vírus da febre do Nilo ocidental, em fase aguda e convalescente, 3 deles possuindo reatividade à proteína E do vírus, porém apenas 4 anticorpos foram capazes de neutralizar o vírus da febre do Nilo ocidental *in vitro* durante o teste de PRNT. Semelhante ao FRNT utilizado em nosso estudo, esses 4 anticorpos neutralizantes isolados pertenciam todos ao grupo de infectados convalescentes, apesar de alguns anticorpos do grupo de infecção aguda apresentarem reatividade ao vírus, eles não foram capazes de neutralização *in vitro* (TSIORIS et al., 2015) assim como os anticorpos isolados neste estudo, sugerindo talvez que uma abordagem em indivíduos com infecção convalescente pode apresentar melhores resultados de anticorpos.

Figura 18. Capacidade de neutralização das imunoglobulinas contra a cepa YFV-17D após diluição seriada (1:5, 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280, 1:5120 e 1:20480)

NOTA: **(A)** Curvas das imunoglobulinas P1A07, P1F08, P1A04, P1D04 e controle negativo anti-SIV (SIV ab). **(B)** Curvas das imunoglobulinas P1F07, P1F10, P1H02 e controle negativo SIV ab.

5 CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo que visa caracterizar a cinética da resposta de plasmoblastos e o repertório de Abs deles derivados em indivíduos vacinados com a formulação 17DD e infectados pelo YFV. Nossos resultados demonstram que a vacinação com 17DD e a infecção natural pelo YFV induzem à expansão de plasmoblastos no sangue periférico sugerindo o papel importante dessas células na reposta imunológica ao YFV.

Os dados gerados pela caracterização do conjunto de Abs derivados dos plasmoblastos coletados no pico de expansão sugerem que a vacinação com 17DD e a infecção pelo YFV estimulou a expansão de um repertório similar de células B. Embora Ig portadoras da família IgVH3 sejam frequentemente detectadas em células B periféricas, a presença de outros genes raros da família IgHV podem ser representativos de uma população de células B ativadas no contexto de vacinação e infecção.

Apesar de alguns anticorpos isolados de indivíduos naturalmente infectados pelo YFV apresentarem uma modesta afinidade de ligação ao vírus vacinal, nenhum deles demonstrou capacidade de neutralizar a cepa 17D *in vitro*. Nossos dados sugerem que a estratégia de isolar Abs derivados de plasmoblastos únicos coletados durante infecção aguda pelo YFV pode não ser a abordagem mais adequada para a busca de Abs de alta afinidade e capacidade neutralizante do YFV.

Os achados deste estudo poderão contribuir para um melhor entendimento sobre a resposta humoral na infecção pelo YFV e também representam os primeiros passos para a triagem de anticorpos neutralizantes com potencial para aplicação como abordagem diagnóstica e/ou terapêutica.

6 ANEXOS

ANEXO A – PARECER DA COORDENADORIA DE ÉTICA EM PESQUISA DA FMUSP

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Caracterização de anticorpos específicos para o vírus da febre amarela em indivíduos adultos infectados e vacinados com 17DD		
Pesquisador: Esper Georges Kallás		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 71348717.1.0000.0068		
Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 2.224.633		
Apresentação do Projeto:		
Estudo que avaliará a cinética de células produtoras de Abs, os plasmoblastos, bem como o repertório de Abs monoclonais (mAbs) dela derivados no sangue periférico de adultos infectados pelo vírus da febre amarela (YFV) ou vacinados com a formulação 17DD. Neste estudo serão utilizadas alíquotas de amostras de sangue periférico de pacientes com YFV nos dias 4, 6, 14 e 30 após o início dos sintomas; e indivíduos imunizados (nos 28 primeiros dias após a vacinação); oriundas de estudos anteriores do grupo, sem coleta adicional.		
Objetivo da Pesquisa:		
Objetivo Primário: caracterizar a resposta de plasmoblastos e o repertório de Abs deles derivados induzidos pela infecção pelo YFV e pela vacinação com a formulação vacinal YFV-17DD. Objetivo Secundário: • Avaliar a cinética da população de plasmoblastos durante a infecção e após a vacinação com a formulação vacinal YFV-17DD; • Caracterizar a sequência das regiões variáveis das cadeias pesada (VH) e leve (VL) dos Abs derivados de plasmoblastos individuais isolados de indivíduos infectados com YFV ou vacinados com YFV-17DD durante o ápice da resposta de plasmoblastos.		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
Sem risco para os participantes, uma vez que a amostras foram colhidas em estudos anteriores		
Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010 UF: SP Município: SAO PAULO Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.224.633

(CAPEPesq 1.752.219, e 0206/10).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto com boa fundamentação teórica, metodologia adequada aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O estudo dispensa TCLE. Sem a necessidade da realização de coleta de amostras adicionais àquelas previamente realizadas nos estudos clínicos anteriores do grupo (CAPEPesq 1.752.219, e 0206/10).

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_949148.pdf	17/07/2017 10:28:26		Aceito
Outros	Cadastro_On_Line_16770_22Jun2017_signed.pdf	17/07/2017 10:28:02	Esper Georges Kallás	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_Assinada.PDF	14/07/2017 13:26:03	MARIANA PRADO MARMORATO	Aceito
Outros	9Resumo.pdf	10/07/2017 15:17:59	MARIANA PRADO MARMORATO	Aceito
Outros	10Autorizacao.pdf	10/07/2017 15:17:04	MARIANA PRADO MARMORATO	Aceito
Outros	8Utilizacao_Amostras.pdf	10/07/2017 15:16:33	MARIANA PRADO MARMORATO	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

7 APÊNDICES

APÊNDICE A – Sequências de Imunoglobulina de cadeia pesada dos voluntários vacinados com a formulação 17DD ou infectados pelo YFV (selvagem) e suas respectivas famílias IgHV, IgHD e IgHJ [V(D)J], também suas identidades em porcentagem (%) correspondente em relação às famílias germinativas, hipermutações somáticas representadas em aminoácidos (aa), comprimento da sequência da região de complementariedade 3 (CDR3) também em aminoácidos.

ID	ID Seq.	IgHV	Identidade IgHV (%)	IgHD	IgHJ	Identidade IgHJ (%)	SHM (aa)	Comprimento CDR3 (aa)
7003 D7	P1A03H3	IgHV3- 15*01	91,8	IgHD6- 19*01	IgHJ4* 02	91,7	17	15
7003 D7	P1B06H7	IgHV4- 59*03	87,4	IgHD4- 23*01	IgHJ5* 02	96,1	20	13
7003 D7	P1B09H4	IgHV3- 21*01	95,5	IgHD6- 13*01	IgHJ4* 02	68,8	7	15
7003 D7	P1F03H1	IgHV4- 4*02	96,1	IgHD3- 22*01	IgHJ4* 02	93,8	9(10)	10
7003 D7	P1F10H2	IgHV3- 74*01	95,8	-	IgHJ6* 02	92,9	9	10
7003 D7	P1F11H1	IgHV1- 2*04	94,1	IgHD1- 26*01	IgHJ3* 02	92	14	11
7003 D7	P1F12H2	IgHV3- 23*04	93,4	IgHD3- 22*01	IgHJ4* 02	91,7	12	23
7003 D7	P1G11H5	IgHV3- 7*03	95,1	IgHD4- 17*01	IgHJ4* 02	93,8	11	10
7003 D7	P1H09H8	IgHV3- 7*03	96,9	IgHD4- 17*01	IgHJ4* 02	89,6	7	10
7003 D14	P1A03H6	IgHV1- 3*01	91,7	IgHD3- 22*01	IgHJ4* 02	79,2	17(18)	14
7003 D14	P1A05H1	IgHV3- 7*01	96,2	IgHD1- 1*01	IgHJ4* 02	85,4	9	9
7003 D14	P1A06H1	IgHV3- 21*01	93,4	IgHD4- 17*01	IgHJ4* 02	93,8	10	15
7003 D14	P1A08H1	IgHV3- 23*04	97,2	IgHD3- 3*01	IgHJ2* 01	96,2	8	21
7003 D14	P1A09H4	IgHV3- 23*01	95,8	IgHD3- 10*01	IgHJ4* 02	93,8	8	13
7003 D14	P1A12H2	IgHV3- 15*01	94,6	IgHD1- 20*01	IgHJ4* 02	89,6	13(14)	12

7003 D14	P1B02H2	IgHV3- 15*01	87,4	IgHD3- 9*01	IgHJ4* 01	91,7	20	15
7003 D14	P1B04H3	IgHV3- 21*01	92,7	IgHD2- 8*01	IgHJ4* 02	85,4	11	12
7003 D14	P1B06H5	IgHV1- 69*01	89,2	IgHD3- 22*01	IgHJ6* 02	96,8	17(18)	23
7003 D14	P1B07H1	IgHV3- 15*01	92,5	IgHD2- 2*01	IgHJ4* 02	83,3	14(15)	8
7003 D14	P1B08H1	IgHV3- 48*02	97,9	IgHD6- 19*01	IgHJ4* 02	89,6	4	12
7003 D14	P1B09H1	IgHV5- 10*01	96,2	IgHD3- 16*01	IgHJ4* 02	91,7	3	15
7003 D14	P1B11H2	IgHV3- 7*01	95,1	IgHD2- 8*01	IgHJ4* 02	89,6	10	18
7003 D14	P1B12H1	IgHV3- 15*01	88,1	IgHD1- 20*01	IgHJ5* 02	70,6	15(16)	9
7003 D14	P1C03H2	IgHV3- 7*01	97,6	-	IgHJ4* 02	93,8	6(7)	18
7003 D14	P1C05H1	IgHV3- 74*01	96,9	IgHD2- 2*02	IgHJ3* 02	90	7	13
7003 D14	P1C06H1	IgHV3- 33*01	95,1	-	IgHJ4* 02	89,6	9(10)	12
7003 D14	P1C07H1	IgHV3- 23*04	93,8	IgHD3- 3*01	IgHJ3* 02	92	14	22
7003 D14	P1C11H1	IgHV1- 18*01	94,2	IgHD6- 19*01	IgHJ4* 01	89,6	21	18
7003 D14	P1C12H1	IgHV3- 15*01	93,9	IgHD1- 20*01	IgHJ4* 02	89,6	14(15)	12
7003 D14	P1D03H1	IgHV1- 3*01	93,4	IgHD2- 8*01	IgHJ3* 02	92	12	19
7003 D14	P1D04H1	IgHV3- 23*04	93,1	IgHD2- 8*01	IgHJ4* 02	91,7	12	14
7003 D14	P1D05H1	IgHV3- 11*05	96,5	-	IgHJ3* 02	98	6	30
7003 D14	P1D07H1	IgHV3- 7*03	93,8	IgHD5- 12*01	IgHJ1* 01	73,1	10(11)	14
7003 D14	P1D08H1	IgHV3- 48*02	92	IgHD2- 21*01	IgHJ3* 02	92	12	13
7003 D14	P1D10H1	IgHV3- 15*01	98,3	IgHD4- 19*01	IgHJ4* 02	100	3	16

D14		23*04		23*01	02			
7003 D14	P1D12H1	IgHV3- 23*04	94,4	IgHD2- 15*01	IgHJ5* 01	94,1	12	20
7003 D14	P1E02H1	IgHV4- 4*02	88,9	IgHD2- 2*01	IgHJ5* 01	86,3	18	15
7003 D14	P1E03H3	IgHV5- 51*01	96,2	IgHD5- 12*01	IgHJ4* 02	95,8	7	19
7003 D14	P1E04H1	IgHV3- 33*03	93,4	-	IgHJ6* 02	62,9	13(14)	11
7003 D14	P1E05H2	IgHV1- 46*02	86,8	IgHD2- 15*01	IgHJ3* 01	90	23	20
7003 D14	P1E08H2	IgHV3- 7*03	94,1	IgHD1- 1*01	IgHJ3* 02	74	10(11)	10
7003 D14	P1E10H1	IgHV3- 74*01	92	IgHD2- 15*01	IgHJ4* 02	89,6	10	19
7003 D14	P1E11H1	IgHV3- 23*04	90,6	IgHD2- 21*01	IgHJ4* 02	95,8	16	15
7003 D14	P1F02H1	IgHV3- 7*01	95,8	IgHD2- 21*02	IgHJ5* 01	72,6	9(11)	15
7003 D14	P1F05H1	IgHV3- 23*04	95,1	IgHD2- 8*01	IgHJ4* 02	89,6	10	14
7003 D14	P1F09H2	IgHV5- 10*01	95,5	IgHD5- 18*01	IgHJ4* 02	87,5	5	11
7003 D14	P1F10H2	IgHV4- 59*01	86,9	IgHD2- 15*01	IgHJ5* 01	90,2	14	16
7003 D14	P1G04H1	IgHV3- 11*03	90,6	IgHD2- 8*01	IgHJ6* 02	77,4	14	13
7003 D14	P1G05H1	IgHV3- 7*03	97,2	IgHD6- 6*01	IgHJ5* 02	78,4	6	9
7003 D14	P1G06H1	IgHV1- 69*01	86,5	IgHD3- 10*01	IgHJ4* 02	87,5	22	14
7003 D14	P1G07H1	IgHV3- 48*02	89,9	IgHD2- 21*01	IgHJ3* 02	92	16	13
7003 D14	P1G08H2	IgHV5- 51*01	92,4	IgHD4- 17*01	IgHJ4* 02	93,8	16	14
7003 D14	P1G12H2	IgHV3- 53*01	91,9	IgHD2- 15*01	IgHJ4* 02	85,4	14(15)	10
7003 D14	P1H05H1	IgHV3- 7*03	91,3	IgHD3- 10*01	IgHJ4* 02	89,6	15	12

7003 D14	P2A03H1	IgHV3- 30*03	94,8	-	-	-	-	-
7003 D14	P2A04H1	IgHV3- 7*03	94,1	-	-	-	-	-
7003 D14	P2A06H1	IgHV3- 15*01	94,9	-	-	-	-	-
7003 D14	P2A07H1	IgHV4- 59*01	95,1	-	IgHJ2* 01	61,5	-	-
7003 D14	P2A08H1	IgHV1- 3*01	90,3	-	-	-	-	-
7003 D14	P2A09H1	IgHV1- 3*01	89,9	-	-	-	-	-
7003 D14	P2A11H1	IgHV3- 9*01	96,9	-	-	-	-	-
7003 D14	P2A12H1	IgHV4- 59*01	93	-	-	-	-	-
7003 D14	P2B06H1	IgHV1- 46*01	95,5	-	-	-	-	-
7003 D14	P2B07H1	IgHV3- 7*03	90,3	-	-	-	-	-
7003 D14	P2C02H1	IgHV3- 7*03	95,8	-	IgHJ3* 02	80	-	-
7003 D14	P2C03H1	IgHV3- 30*03	94,8	-	-	-	-	-
7003 D14	P2C05H1	IgHV3- 11*05	85,4	-	-	-	-	-
7003 D14	P2C07H1	IgHV1- 69*01	92,7	-	-	-	-	-
7003 D14	P2C10H1	IgHV1- 69*01	93,4	-	-	-	-	-
7003 D14	P2C12H1	IgHV5- 10*02	85,1	-	-	-	-	-
7003 D14	P2D02H1	IgHV3- 23*04	91,3	-	-	-	-	-
7003 D14	P2D04H1	IgHV3- 7*01	98,3	-	IgHJ3* 02	80	-	-
7003 D14	P2D10H1	IgHV3- 48*02	95,8	-	IgHJ5* 01	61,1	-	-
7003	P2E02H1	IgHV3-	92	-	-	-	-	-

D14		23*01						
7003 D14	P2E03H1	IgHV1- 3*01	93,8	-	-	-	-	-
7003 D14	P2E04H1	IgHV3- 23*04	94,1	-	-	-	-	-
7003 D14	P2E05H1	IgHV3- 48*02	87,8	-	-	-	-	-
7003 D14	P2E08H1	IgHV1- 46*01	93,4	-	-	-	-	-
7003 D14	P2E10H1	IgHV3- 7*03	97,9	-	IgHJ2* 01	62,5	-	-
7003 D14	P2F03H1	IgHV3- 23*04	91,7	-	-	-	-	-
7003 D14	P2F06H1	IgHV3- 30*03	96,5	-	-	-	-	-
7003 D14	P2F08H1	IgHV5- 51*01	93,8	-	IgHJ5* 01	63,2	-	-
7003 D14	P2F09H1	IgHV3- 53*01	76,8	-	-	-	-	-
7003 D14	P2F10H1	IgHV3- 23*04	93,8	-	IgHJ6* 03	63,6	-	-
7003 D14	P2F11H1	IgHV3- 23*04	95,5	-	-	-	-	-
7003 D14	P2F12H1	IgHV4- 59*01	95,4	-	-	-	-	-
7003 D14	P2G03H1	IgHV3- 30*03	94,8	-	IgHJ5* 01	65	-	-
7003 D14	P2G05H1	IgHV3- 48*02	94,8	-	-	-	-	-
7003 D14	P2G07H1	IgHV3- 30*03	94,1	-	-	-	-	-
7003 D14	P2G08H1	IgHV1- 8*01	92,4	-	IgHJ1* 01	66,7	-	-
7003 D14	P2G10H1	IgHV3- 23*04	92	-	-	-	-	-
7003 D14	P2G11H1	IgHV3- 15*01	89,5	-	-	-	-	-
7003 D14	P2G12H1	IgHV3- 48*02	92,4	-	-	-	-	-

7003 D14	P2H03H1	IgHV3- 23*04	89,2	-	-	-	-	-
7003 D14	P2H04H1	IgHV3- 74*01	83,7	IgHD6- 25*01	IgHJ5* 01	65	-	-
7003 D14	P2H05H1	IgHV3- 49*03	91,2	-	-	-	-	-
7003 D14	P2H08H1	IgHV4- 39*01	92,8	-	-	-	-	-
7003 D14	P2H09H1	IgHV3- 9*01	92,7	-	-	-	-	-
7003 D14	P2H11H1	IgHV3- 7*03	94,1	-	-	-	-	-
7006 D7	P1B06H7	IgHV1- 2*02	88,2	IgHD5- 12*01	IgHJ4* 02	79,2	15	11
7006 D7	P1D07H8	IgHV3- 11*05	93,4	IgHD2- 21*02	IgHJ4* 02	91,7	12	13
7006 D7	P1E02H3	IgHV3- 15*01	88,4	IgHD6- 19*01	IgHJ5* 01	80,4	16(17)	15
7006 D7	P1F09H4	IgHV3- 48*02	96,5	IgHD6- 13*01	IgHJ4* 02	93,8	3	16
7006 D7	P1G02H3	IgHV3- 30*03	88,9	IgHD3- 22*01	IgHJ2* 01	88,7	20	13
7006 D7	P1H07H8	IgHV3- 23*04	95,8	IgHD6- 19*01	IgHJ4* 02	93,8	8	17
7006 D7	P2A05H4	IgHV3- 23*04	90,6	IgHD3- 22*01	IgHJ3* 02	96	12	19
7006 D7	P2A12H2	IgHV4- 4*08	94	IgHD3- 22*01	IgHJ5* 02	94,1	11	18
7006 D7	P2B07H1	IgHV5- 51*01	95	IgHD2- 2*01	IgHJ6* 02	89,5	10	21
7006 D7	P2C05H3	IgHV3- 72*01	98,6	IgHD3- 22*01	IgHJ4* 02	92,1	16	16
7006 D7	P2D04H7	IgHV4- 59*01	96,1	IgHD2- 21*01	IgHJ5* 02	97,2	3	13
7006 D7	P2D12H1	IgHV3- 48*02	88,5	IgHD3- 22*01	IgHJ2* 01	79,2	6	17
7006 D7	P2E03H1	IgHV3- 23*04	97,2	IgHD2- 21*01	IgHJ4* 02	92,2	17(18)	14
7006	P2F09H2	IgHV3-	95,3	IgHD2-	IgHJ4*	94,6	16	14

D7		74*01		15*01	02			
7006 D7	P2G11H1	IgHV3- 15*01	95,6	IgHD2- 15*01	IgHJ4* 02	88,6	26	11
7006 D7	P2H02H1	IgHV3- 43*01	91,3	IgHD3- 22*01	IgHJ4* 02	81,3	24	14
7006 D14	P1A11H4	IgHV5- 51*01	97,2	IgHD5- 12*01	IgHJ6* 02	79	6	17
7006 D14	P1D06H6	IgHV3- 30*18	93,8	IgHD1- 26*01	IgHJ6* 02	85,5	18	19
7006 D14	P1G09H8	IgHV3- 48*04	87,8	IgHD4- 23*01	IgHJ3* 02	92	13	13
7006 D14	P1G12H3	IgHV5- 51*01	96,5	IgHD1- 7*01	IgHJ4* 02	83,3	7(8)	14
7006 D14	P1H09H1	IgHV3- 30*01	93,8	IgHD2- 15*01	IgHJ6* 02	95,2	12	23
1002 D6	P1A05H1	IgHV1- 69*01	80,6	IgHD2- 15*01	IgHJ6* 02	82,3	27	22
1002 D6	P1A06H1	IgHV3- 23*04	92,4	IgHD2- 21*01	IgHJ4* 02	89,6	12	17
1002 D6	P1A07H2	IgHV4- 34*01	100	IgHD6- 6*01	IgHJ4* 02	93,8	0	18
1002 D6	P1A09H3	IgHV- 51*01	95,8	IgHD6- 25*01	IgHJ4* 02	97,9	9	18
1002 D6	P1A10H2	IgHV3- 48*03	97,2	IgHD6- 6*01	IgHJ4* 02	87,5	3	16
1002 D6	P1A11H1	IgHV3- 49*04	92,2	IgHD3- 22*01	IgHJ3* 02	92	14	23
1002 D6	P1B02H2	IgHV1- 18*01	99	IgHD4- 17*01	IgHJ3* 02	96	3	17
1002 D6	P1B03H2	IgHV3- 30*02	93,4	IgHD5- 12*01	IgHJ4* 02	81,8	12	6
1002 D6	P1B04H1	IgHV3- 23*04	94,1	IgHD6- 19*01	IgHJ5* 01	90,2	13(15)	16
1002 D6	P1B10H1	IgHV4*34- 01	94,4	IgHD1- 1*01	IgHJ6* 03	82,3	8	22
1002 D6	P1B11H1	IgHV3- 30*02	94,4	IgHD4- 11*01	IgHJ6* 03	66,1	10	20
1002 D6	P1B12H2	IgHV4- 4*07	99,7	IgHD6- 6*01	IgHJ6* 03	67,7	0	17

1002 D6	P1C05H1	IgHV3- 48*03	96,2	IgHD3- 10*01	IgHJ4* 02	83,3	6	16
1002 D6	P1C06H1	IgHV3- 9*01	98,3	IgHD2- 8*02	IgHJ6* 02	69,4	5(6)	16
1002 D6	P1C09H1	IgHV3- 74*01	98,3	IgHD2- 8*02	IgHJ4* 02	87,5	5	11
1002 D6	P1C11H2	IgHV3- 74*01	91,7	IgHD6- 19*01	IgHJ4* 02	67,7	15	19
1002 D6	P1C12H1	IgHV4- 30*01	98,3	IgHD3- 22*01	IgHJ4* 02	91,7	3	12
1002 D6	P1D02H1	IgHV3- 30*02	92,3	IgHD2- 2*01	IgHJ4* 02	91,7	11	19
1002 D6	P1D04H1	IgHV3- 33*01	98,6	IgHD6- 19*01	IgHJ6* 02	69,4	3	18
1002 D6	P1D05H3	IgHV3- 23*04	92,7	IgHD3- 10*01	IgHJ5* 02	78,4	12	18
1002 D6	P1E02H1	IgHV4- 59*01	98,6	IgHD1- 26*01	IgHJ4* 02	100	3	23
1002 D6	P1E03H7	IgHV3- 74*01	99,3	IgHD5- 12*01	IgHJ4* 02	87,5	2	13
1002 D6	P1E07H1	IgHV3- 23*04	89,6	IgHD3- 3*01	IgHJ2* 01	88,7	16	21
1002 D6	P1E08H4	IgHV3- 23*04	93,1	IgHD2- 2*01	IgHJ6* 02	91,9	12	16
1002 D6	P1E10H1	IgHV5- 51*03	80,8	IgHD3- 22*01	IgHJ4* 02	93,8	27	15
1002 D6	P1F02H1	IgHV5- 51*03	96,9	IgHD2- 21*02	IgHJ4* 02	85,4	8	12
1002 D6	P1F03H1	IgHV3- 33*01	93,4	IgHD2- 2*02	IgHJ3* 02	68	10	22
1002 D6	P1F05H1	IgHV3- 74*01	98,3	IgHD2- 8*02	IgHJ4* 02	87,5	6	11
1002 D6	P1F07H1	IgHV3- 30*02	91	IgHD3- 9*01	IgHJ6* 03	66,1	16	18
1002 D6	P1F08H1	IgHV4- 61*01	91,1	IgHD5- 12*01	IgHJ3* 01	96	11	18
1002 D6	P1F12H1	IgHV1- 2*02	94,4	IgHD3- 22*01	IgHJ4* 03	91,7	13	20
1002	P1G03H1	IgHV4-	94,4	IgHD4-	IgHJ2*	86,8	13	16

D6		59*01		17*01	01			
1002 D6	P1G07H1	IgHV3-74*01	97,2	IgHD2-8*02	IgHJ4*02	87,5	7	11
1002 D6	P1G08H1	IgHV3-23*04	93	IgHD3-3*01	IgHJ4*02	93,8	12	21
1002 D6	P1G09H1	IgHV3-11*04	96,9	IgHD6-6*01	IgHJ4*02	79,2	4	13
1002 D6	P1G11H1	IgHV3-9*01	98,3	IgHD3-16*02	IgHJ3*02	70	2(3)	20
1002 D6	P1G12H5	IgHV3-7*01	94,8	IgHD4-23*01	IgHJ4*02	91,7	10(11)	10
1002 D6	P1H03H2	IgHV3-23*04	92	IgHD3-16*01	IgHJ5*02	96,1	10	17
1002 D6	P1H06H7	IgHV3-15*01	98,6	IgHD2-2*01	IgHJ4*02	89,6	2	17
1002 D6	P1H07H2	IgHV3-49*05	95,6	IgHD5-18*01	IgHJ3*01	62	10	26
1002 D6	P1H08H1	IgHV1-18*01	96,5	IgHD1-26*01	IgHJ4*02	93,8	6	10
1002 D6	P1H09H1	IgHV3-74*01	96,1	IgHD6-13*01	IgHJ6*03	79	6	18
1002 D6	P1H11H1	IgHV4-39*07	93,1	IgHD4-17*01	IgHJ4*02	93,8	14	13
1002 D14	P1A04H5	IgHV3-7*01	99,7	IgHD3-10*01	IgHJ5*02	96,1	0	9
1002 D14	P1A05H3	IgHV3-21*01	97,9	IgHD2-2*02	IgHJ3*02	98,0	4	18
1002 D14	P1A06H1	IgHV3-11*01	92,7	IgHD5-24*01	IgHJ4*02	91,7	11	13
1002 D14	P1A07H3	IgHV3-11*01	99,3	IgHD6-13*01	IgHJ4*02	83,3	1(2)	10
1002 D14	P1A08H1	IgHV4-59*01	99,7	IgHD3-10*01	IgHJ6*02	90,3	1	18
1002 D14	P1A10H5	IgHV3-72*01	100,0	IgHD4-23*01	IgHJ4*02	85,4	0	10
1002 D14	P1A12H4	IgHV3-72*01	99,7	IgHD3-10*01	IgHJ4*02	89,6	0	10
1002 D14	P1B03H1	IgHV3-72*01	98,3	IgHD2-2*01	IgHJ4*02	91,7	4	9

1002 D14	P1B04H1	IgHV3- 11*04	99,3	IgHD1- 7*01	IgHJ6* 03	95,2	2	16
1002 D14	P1B05H1	IgHV1- 2*02	99,3	IgHD3- 22*01	IgHJ5* 02	92,2	2	19
1002 D14	P1B06H1	IgHV3- 11*01	99,7	IgHD3- 3*01	IgHJ6* 02	69,4	1	26
1002 D14	P1B07H1	IgHV3- 72*01	98,6	IgHD4- 17*01	IgHJ6* 02	68,4	2	10
1002 D14	P1B08H1	IgHV3- 21*01	99,7	IgHD2- 15*01	IgHJ6* 02	77,4	1(2)	18
1002 D14	P1B09H5	IgHV1- 46*01	93,4	IgHD2- 15*01	IgHJ4* 02	81,3	16	17
1002 D14	P1B10H3	IgHV3- 23*04	99,0	IgHD3- 9*01	IgHJ4* 02	95,8	2(3)	17
1002 D14	P1B10H3	IgHV3- 23*04	99,0	IgHD3- 9*01	IgHJ4* 02	95,8	2(3)	17
1002 D14	P1C02H1	IgHV3- 9*01	100,0	IgHD2- 2*02	IgHJ6* 02	98,4	0(1)	23
1002 D14	P1C04H3	IgHV4- 39*03	95,5	IgHD2- 2*01	IgHJ4* 01	93,8	8	17
1002 D14	P1C05H2	IgHV5- 51*01	89,9	IgHD6- 13*01	IgHJ5* 02	96,1	19	18
1002 D14	P1C08H2	IgHV3- 72*01	100,0	IgHD2- 21*01	IgHJ6* 03	82,1	0	10
1002 D14	P1C12H1	IgHV3- 21*01	99,7	IgHD6- 6*01	IgHJ5* 02	98,0	1	15
1002 D14	P1D02H1	IgHV3- 72*01	100,0	IgHD2- 8*01	IgHJ6* 02	87,5	0	10
1002 D14	P1D03H1	IgHV1- 2*02	99,3	IgHD3- 3*01	IgHJ6* 02	74,2	2	19
1002 D14	P1D04H1	IgHV3- 15*01	90,1	IgHD3- 16*01	IgHJ4* 02	77,1	14	8
1002 D14	P1D06H2	IgHV3- 74*01	96,9	IgHD3- 10*01	IgHJ3* 02	90,0	5	13
1002 D14	P1D10H1	IgHV3- 48*02	94,4	IgHD3- 3*01	IgHJ4* 02	85,4	11(13)	14
1002 D14	P1D11H1	IgHV1- 69*01	99,0	IgHD6- 13*01	IgHJ6* 03	91,9	3	21
1002	P1D12H1	IgHV3-	99,3	IgHD2-	IgHJ6*	93,6	1	25

D14		15*01		2*02	03			
1002 D14	P1D12H2	IgHV3- 15*01	99,3	IgHD2- 2*02	IgHJ6* 03	88,7	1	24
1002 D14	P1E02H2	IgHV3- 72*01	99,3	IgHD5- 18*01	IgHJ3* 02	70,0	1	12
1002 D14	P1E03H1	IgHV3- 74*01	95,1	IgHD2- 8*02	IgHJ4* 02	89,6	12	10
1002 D14	P1E04H1	IgHV3- 72*01	99,3	IgHD3- 10*01	IgHJ6* 03	91,8	0(1)	10
1002 D14	P1E05H3	IgHV4- 39*01	90,0	IgHD3- 10*01	IgHJ3* 01	96,0	17	21
1002 D14	P1E06H1	IgHV1- 2*02	99,7	IgHD3- 3*01	IgHJ4* 02	87,5	0	14
1002 D14	P1E10H1	IgHV3- 72*01	99,3	IgHD3- 10*01	IgHJ6* 02	89,3	1	10
1002 D14	P1E11H1	IgHV3- 72*01	99,7	IgHD3- 3*01	IgHJ4* 02	89,6	1	11
1002 D14	P1F03H1	IgHV3- 72*01	99,3	IgHD1- 1*01	IgHJ3* 02	92,0	1	10
1002 D14	P1F04H1	IgHV3- 7*01	96,2	IgHD1- 26*01	IgHJ4* 02	83,0	8	7
1002 D14	P1F05H2	IgHV1- 2*02	94,4	IgHD1- 20*01	IgHJ4* 02	93,8	8	10
1002 D14	P1F07H2	IgHV4- 39*07	99,0	IgHD2- 8*01	IgHJ6* 03	84,2	2	10
1002 D14	P1F09H4	IgHV3- 15*01	99,7	IgHD4- 17*01	IgHJ4* 02	89,6	0	14
1002 D14	P1F10H1	IgHV1- 2*02	99,3	IgHD3- 22*01	IgHJ3* 02	98,0	0	21
1002 D14	P1F11H5	IgHV3- 15*01	99,7	IgHD6- 13*01	IgHJ6* 02	88,7	1	13
1002 D14	P1G03H4	IgHV4- 39*03	87,9	IgHD1- 7*01	IgHJ3* 01	88,0	21	13
1002 D14	P1G04H3	IgHV3- 7*01	92,7	IgHD1- 26*01	IgHJ4* 02	91,7	11	11
1002 D14	P1G05H7	IgHV4- 39*07	97,3	IgHD3- 3*01	IgHJ4* 02	87,5	5	19
1002 D14	P1G06H3	IgHV4- 39*07	95,5	IgHD1- 7*01	IgHJ6* 03	96,8	9(10)	21

1002 D14	P1G09H4	IgHV4- 30*01	97,3	IgHD1- 26*01	IgHJ4* 03	77,1	4	15
1002 D14	P1G10H8	IgHV3- 30*02	91,7	IgHD5- 18*01	IgHJ4* 02	84,1	14	6
1002 D14	P1G11H6	IgHV3- 48*02	99,0	IgHD6- 19*01	IgHJ5* 02	82,4	3	13
1002 D14	P1H02H1	IgHV3- 7*01	96,9	IgHD5- 12*01	IgHJ4* 02	68,8	6	13
1002 D14	P1H03H1	IgHV4- 4*07	99,7	IgHD3- 3*01	IgHJ6* 03	93,4	1	12
1002 D14	P1H04H3	IgHV3- 72*01	99,7	-	IgHJ6* 03	69,6	1	10
1002 D14	P1H06H1	IgHV1- 46*01	96,2	IgHD5- 18*01	IgHJ5* 02	88,2	7	18
1002 D14	P1H08H5	IgHV3- 23*04	99,3	IgHD3- 10*01	IgHJ6* 02	71,0	1	23
1002 D14	P1H09H1	IgHV1- 69*01	89,2	IgHD3- 3*02	IgHJ4* 02	85,4	15	18
1002 D14	P1H11H3	IgHV1- 46*01	99,7	IgHD2- 2*01	IgHJ4* 02	93,8	1	10
1008 D12	P1A03H1	IgHV4- 61*02	99,7	IgHD3- 9*01	IgHJ6* 03	67,7	1(2)	15
1008 D12	P1A04H1	IgHV3- 72*01	96,9	IgHD4- 11*01	IgHJ4* 02	83,3	2(3)	7
1008 D12	P1A06H7	IgHV3- 30*01	95,5	IgHD2- 2*02	IgHJ4* 02	93,8	8	12
1008 D12	P1A08H1	IgHV1- 18*04	99,7	IgHD3- 3*01	IgHJ3* 02	98,0	1	16
1008 D12	P1A10H1	IgHV4- 31*03	97,6	IgHD2- 21*02	IgHJ3* 02	100,0	5	17
1008 D12	P1B02H2	IgHV4- 31*03	100,0	IgHD1- 1*01	IgHJ6* 02	80,7	0	16
1008 D12	P1B04H1	IgHV3- 33*01	99,0	IgHD6- 6*01	IgHJ4* 02	95,8	2	10
1008 D12	P1B06H1	IgHV3- 15*01	99,7	IgHD3- 9*01	IgHJ4* 02	89,6	1	16
1008 D12	P1B09H1	IgHV3- 72*01	96,9	IgHD3- 10*01	IgHJ4* 02	85,4	6	7
1008	P1B10H1	IgHV3-	100,0	IgHD5-	IgHJ5*	94,1	0	10

D12		72*01		24*01	02			
1008 D12	P1B11H1	IgHV4- 59*08	92,3	IgHD2- 15*01	IgHJ6* 02	62,9	14	21
1008 D12	P1C02H1	IgHV3- 30*01	97,9	IgHD2- 2*01	IgHJ6* 02	62,9	4	23
1008 D12	P1C03H1	IgHV3- 30*01	97,9	IgHD2- 2*01	IgHJ6* 02	72,6	5	23
1008 D12	P1C05H1	IgHV4- 4*02	93,8	IgHD7- 27*01	IgHJ4* 02	93,8	11	10
1008 D12	P1C06H1	IgHV3- 72*01	99,7	IgHD3- 16*01	IgHJ3* 02	70,0	1	9
1008 D12	P1C07H1	IgHV3- 7*03	82,6	IgHD1- 26*01	IgHJ3* 02	80,0	28	11
1008 D12	P1C09H1	IgHV4- 59*08	95,1	IgHD6- 13*01	IgHJ5* 01	92,2	7(8)	16
1008 D12	P1C11H1	IgHV1- 58*02	99,3	IgHD3- 10*01	IgHJ3* 02	94,0	1(2)	16
1008 D12	P1C12H1	IgHV4- 4*02	99,0	IgHD6- 13*01	IgHJ4* 02	89,6	2	12
1008 D12	P1D03H1	IgHV1- 46*01	87,2	IgHD4- 17*01	IgHJ4* 01	87,5	18(19)	12
1008 D12	P1D04H1	IgHV4- 31*03	99,3	IgHD3- 10*01	IgHJ4* 02	89,6	1	11
1008 D12	P1D05H1	IgHV3- 72*01	99,0	IgHD6- 19*01	IgHJ4* 02	97,9	1	11
1008 D12	P1D06H1	IgHV4- 4*02	100,0	IgHD5- 24*01	IgHJ1* 01	94,2	0(1)	12
1008 D12	P1D10H1	IgHV3- 72*01	99,3	IgHD3- 9*01	IgHJ5* 01	86,3	2	11
1008 D12	P1D11H1	IgHV3- 7*02	99,3	IgHD1- 26*01	IgHJ6* 02	91,9	0(1)	16
1008 D12	P1E02H1	IgHV3- 64*06	91,7	IgHD3- 9*01	IgHJ1* 01	76,9	13	26
1008 D12	P1E05H1	IgHV4- 30*01	99,7	IgHD3- 22*01	IgHJ2* 01	92,5	1	15
1008 D12	P1E06H2	IgHV4- 30*01	100,0	IgHD3- 22*01	IgHJ2* 01	92,5	0	15
1008 D12	P1E07H1	IgHV3- 23*04	91,0	IgHD5- 18*01	IgHJ4* 02	89,6	12	13

1014 D6	P1A03H1	IgHV3- 33*01	95,8	IgHD3- 10*01	IgHJ4* 02	89,6	6	15
1014 D6	P1A04H1	IgHV5- 51*01	90,3	IgHD3- 3*01	IgHJ4* 02	93,8	15	20
1014 D6	P1A06H2	IgHV3- 23*01	94,1	IgHD4- 17*01	IgHJ6* 02	66,1	11	16
1014 D6	P1A07H1	IgHV3- 33*01	99,0	IgHD1- 26*01	IgHJ6* 02	75,8	2	20
1014 D6	P1A10H2	IgHV5- 51*03	96,2	IgHD3- 9*01	IgHJ4* 02	87,5	10	14
1014 D6	P1B02H1	IgHV1- 18*01	99,7	IgHD3- 3*01	IgHJ1* 01	96,2	0(1)	20
1014 D6	P1B03H1	IgHV3- 43*01	94,8	IgHD3- 22*01	IgHJ4* 02	91,7	8(9)	14
1014 D6	P1B05H1	IgHV3- 20*01	90,6	IgHD6- 6*01	IgHJ6* 03	64,5	16	28
1014 D6	P1C02H3	IgHV3- 21*01	99,7	IgHD1- 26*01	IgHJ4* 02	89,6	0	13
1014 D6	P1C03H3	IgHV4- 38*01	99,7	IgHD4- 17*01	IgHJ4* 02	91,7	1(2)	11
1014 D6	P1C04H2	IgHV3- 21*01	99,7	IgHD6- 19*01	IgHJ4* 02	89,6	1	12
1014 D6	P1C08H1	IgHV3- 21*01	99,7	IgHD6- 19*01	IgHJ4* 02	89,6	0	12
1014 D6	P1C09H1	IgHV4- 4*02	99,0	IgHD2- 21*02	IgHJ4* 02	95,8	2	13
1014 D6	P1C10H3	IgHV3- 43*01	99,3	IgHD6- 25*01	IgHJ4* 02	93,8	1(2)	11
1014 D6	P1D04H1	IgHV4- 39*01	94,5	IgHD7- 27*01	IgHJ5* 02	90,2	10	10
1014 D6	P1D06H3	IgHV3- 30*04	99,0	IgHD3- 22*01	IgHJ3* 02	72,0	2	18
1014 D6	P1D06H3	IgHV3- 30*04	99,0	IgHD3- 22*01	IgHJ3* 02	72,0	2	18
1014 D6	P1D07H1	IgHV4- 4*02	99,3	IgHD1- 26*01	IgHJ4* 02	85,4	2	8
1014 D6	P1D09H1	IgHV3- 48*03	99,5	IgHD3- 22*01	IgHJ6* 03	72,6	1	13
1014	P1D12H1	IgHV4-	96,5	IgHD2-	IgHJ4*	85,4	5	13

D6		38*01		2*01	02			
1014 D6	P1E02H1	IgHV3- 30*01	92,0	IgHD5- 24*01	IgHJ3* 02	94,0	16	20
1014 D6	P1E04H1	IgHV3- 43*01	95,1	IgHD3- 22*01	IgHJ4* 02	91,7	7(8)	14
1014 D6	P1E06H1	IgHV3- 23*04	98,6	IgHD3- 3*01	IgHJ6* 02	67,7	2(4)	15
1014 D6	P1E09H4	IgHV6- 1*01	90,6	IgHD3- 16*02	IgHJ5* 02	78,4	13(15)	9
1014 D6	P1E12H3	IgHV3- 33*01	98,6	IgHD3- 10*01	IgHJ6* 03	82,3	1	19
1014 D6	P1F02H3	IgHV3- 43*01	99,3	IgHD2- 2*02	IgHJ4* 02	91,7	1	21
1023 D6	P1A02H1	IgHV3- 74*01	96,9	IgHD3- 9*01	IgHJ2* 01	86,8	7	18
1023 D6	P1A07H6	IgHV4- 59*01	94,0	IgHD1- 26*01	IgHJ4* 02	95,8	13	11
1023 D6	P1A08H6	IgHV3- 7*03	99,0	IgHD3- 22*01	IgHJ4* 02	95,8	2(3)	9
1023 D6	P1A10H1	IgHV1- 46*01	90,3	IgHD3- 22*01	IgHJ6* 03	75,8	16	17
1023 D6	P1A11H1	IgHV3- 21*01	95,5	IgHD4- 17*01	IgHJ4* 02	83,3	6	13
1023 D6	P1B02H1	IgHV3- 48*02	100,0	IgHD6- 19*01	IgHJ4* 02	100,0	0	14
1023 D6	P1B03H1	IgHV1- 2*02	93,1	IgHD4- 17*01	IgHJ4* 02	97,9	15	12
1023 D6	P1B07H1	IgHV3- 21*01	94,4	IgHD3- 3*01	IgHJ4* 02	64,6	10	19
1023 D6	P1B09H1	IgHV4- 34*01	88,8	IgHD3- 22*01	IgHJ3* 02	70,0	17	25
1023 D6	P1B10H1	IgHV6- 1*01	96,3	IgHD5- 12*01	IgHJ6* 03	77,4	6	17
1023 D6	P1B11H3	IgHV1- 18*04	96,5	IgHD1- 26*01	IgHJ4* 02	93,8	7	14
1023 D6	P1B12H2	IgHV1- 2*02	92,7	IgHD3- 10*01	IgHJ4* 02	100,0	15	19
1023 D6	P1C02H1	IgHV5- 51*01	93,1	IgHD1- 26*01	IgHJ3* 02	66,0	12	14

1023 D6	P1C03H5	IgHV1- 8*01	95,1	IgHD2- 15*01	IgHJ6* 03	90,3	7	21
1023 D6	P1C04H1	IgHV5- 51*01	88,5	IgHD2- 21*02	IgHJ6* 03	80,7	21	15
1023 D6	P1C05H1	IgHV3- 23*04	96,9	IgHD2- 2*01	IgHJ4* 02	91,7	7	19
1023 D6	P1C06H1	IgHV4- 39*01	92,4	IgHD3- 3*01	IgHJ5*0 2	84,3	14	16
1023 D6	P1C07H1	IgHV4- 39*01	92,4	IgHD3- 3*01	IgHJ5*0 2	84,3	13	16
1023 D6	P1C09H1	IgHV3- 11*06	89,6	IgHD6- 6*01	IgHJ5*0 2	94,1	18	22
1023 D6	P1C11H1	IgHV4- 59*01	94,7	IgHD2- 8*01	IgHJ4*0 2	95,8	10(11)	13
1023 D6	P1C12H1	IgHV4- 34*01	92,6	IgHD2- 2*01	IgHJ4*0 2	89,6	12	13
1023 D6	P1D02H1	IgHV3- 49*05	90,8	IgHD4- 11*01	IgHJ5*0 2	96,1	16	15
1023 D6	P1D04H1	IgHV3- 49*05	91,2	IgHD4- 11*01	IgHJ5*0 2	94,1	14	15
1023 D6	P1D05H1	IgHV4- 59*01	94,7	IgHD2- 8*01	IgHJ6*0 3	64,5	10	22
1023 D6	P1D06H1	IgHV5- 51*01	93,1	IgHD1- 26*01	IgHJ3*0 2	90,0	14	14
1023 D6	P1D07H1	IgHV4- 39*01	94,2	IgHD5- 18*01	IgHJ4*0 2	89,6	12	16
1028 D6	P1A05H1	IgHV3- 23*01	97,2	IgHD3- 22*01	IgHJ6*0 2	79,0	6	21
1028 D6	P1A06H4	IgHV3- 33*01	95,5	IgHD2- 15*01	IgHJ4*0 2	95,8	8	21
1028 D6	P1A07H2	IgHV3- 21*01	95,1	IgHD5- 12*01	IgHJ4*0 2	81,3	4	12
1028 D6	P1B02H2	IgHV1- 46*01	89,9	IgHD2- 15*01	IgHJ3*0 2	94,0	23	16
1028 D6	P1B03H5	IgHV4- 4*02	90,6	IgHD4- 11*01	IgHJ1*0 1	84,6	17(18)	14
1028 D6	P1B05H1	IgHV5- 51*01	95,8	IgHD3- 9*01	IgHJ3*0 2	74,0	9	22
1028	P1B08H1	IgHV3-	92,0	IgHD3-	IgHJ3*0	66,0	12(13)	17

D6		30*03		9*01	2			
1028 D6	P1B12H7	IgHV3-21*01	95,1	IgHD5-12*01	IgHJ4*02	81,3	4	12
1028 D6	P1C08H1	IgHV5-51*03	95,5	IgHD1-26*01	IgHJ4*02	97,9	9	15
1028 D6	P1C10H1	IgHV3-21*01	95,5	IgHD5-12*01	IgHJ4*02	81,3	4	12
1028 D6	P1C12H1	IgHV1-18*01	96,2	IgHD3-10*01	IgHJ6*02	62,9	6	26
1028 D6	P1D03H6	IgHV3-21*01	94,4	IgHD5-12*01	IgHJ4*02	81,3	5	12
1028 D6	P1D05H1	IgHV3-30*03	92,4	IgHD3-3*01	IgHJ6*04	68,3	15(16)	24
1028 D6	P1D09H1	IgHV3-48*03	97,9	IgHD3-9*01	IgHJ5*02	96,1	3	17
1028 D6	P1D10H1	IgHV1-2*02	94,1	IgHD2-2*01	IgHJ5*02	84,3	12(13)	13
1028 D6	P1E02H2	IgHV1-18*01	96,9	IgHD2-8*02	IgHJ4*02	91,7	8	12
1028 D6	P1E04H2	IgHV5-51*03	96,2	IgHD3-9*01	IgHJ4*02	87,5	9	14
1028 D6	P1E06H1	IgHV1-46*02	87,2	IgHD3-9*01	IgHJ3*02	70,0	21(22)	19
1028 D6	P1E08H4	IgHV3-11*01	96,9	IgHD6-19*01	IgHJ5*02	86,3	7	11
1028 D6	P1E10H2	IgHV3-21*01	95,5	-	IgHJ1*01	68,0	6	8
1028 D6	P1E11H3	IgHV3-53*01	88,1	IgHD3-9*01	IgHJ6*02	71,0	19(20)	18
1028 D6	P1F02H3	IgHV3-21*01	95,8	IgHD5-12*01	IgHJ4*02	81,3	5	12
1028 D6	P1F05H6	IgHV3-33*01	93,4	IgHD3-10*01	IgHJ4*02	83,3	11	14
1028 D6	P1F06H2	IgHV3-9*01	94,4	IgHD5-18*01	IgHJ1*01	86,5	11	14
1028 D6	P1F09H7	IgHV1-2*02	93,8	IgHD6-13*01	IgHJ4*02	81,3	9(10)	16
1028 D6	P1F12H1	IgHV3-48*03	94,4	IgHD5-18*01	IgHJ4*02	95,8	8	16

1028 D6	P1G02H2	IgHV3- 33*03	95,8	IgHD3- 9*01	IgHJ4*0 2	89,6	9	16
1028 D6	P1G06H6	IgHV3- 49*03	92,9	IgHD5- 24*01	IgHJ3*0 2	88,0	13	12
1028 D6	P1G08H1	IgHV3- 9*01	95,5	IgHD6- 13*01	IgHJ5*0 2	88,2	8	15
1028 D6	P1G12H3	IgHV5- 51*03	94,4	IgHD6- 13*01	IgHJ6*0 2	67,7	11(12)	23
1028 D6	P1H03H7	IgHV3- 21*01	95,1	IgHD5- 12*01	IgHJ4*0 2	81,3	4	12
1028 D6	P1H06H1	IgHV1- 2*02	94,4	IgHD3- 22*01	IgHJ6*0 2	67,7	13	23
1028 D6	P1H07H3	IgHV3- 64*01	92,0	IgHD1- 14*01	IgHJ4*0 2	89,6	13	13
1028 D6	P1H11H4	IgHV3- 21*01	95,5	IgHD1- 1*01	IgHJ4*0 2	81,3	3	12

APÊNDICE B – Sequências de Imunoglobulina de cadeia leve dos voluntários vacinados com a formulação 17DD ou infectados pelo YFV (selvagem) e suas respectivas famílias de IgHV e IgHJ (VJ), também suas identidades em porcentagem (%) correspondente em relação às famílias germinativas, hipermutações somáticas representadas em aminoácidos (aa), comprimento da sequência da complementariedade 3 (CDR3) também em aminoácidos.

ID	ID Seq.	IgLV	Identidade IgLV (%)	IgLJ	Identidade IgLJ (%)	SHM (aa)	Comprimento CDR3 (aa)
7003 D7	P1A02K1	IgKV3-20*01	94,7	IgKJ3*01	89,5	10	9
7003 D7	P1A03L2	IgL2V2-11*01	92,7	IgL2J2*01	86,8	15(17)	11
7003 D7	P1A10K5	IgKV2-28*01	95,2	IgKJ1*01	94,6	10	9
7003 D7	P1A11K1	IgKV4-1*01	97,3	IgKJ2*01	100	7	9
7003 D7	P1B04K2	IgKV4-1*01	86,9	IgKJ1*01	91,7	21	9
7003 D7	P1B06L8	IgL2V1-44*01	90,5	IgL2J2*01	91,4	18	11
7003 D7	P1C03K3	IgKV3-20*01	86,5	IgKJ4*01	100	25	9
7003 D7	P1C09K2	IgKV2-28*01	85	IgKJ1*01	86,8	22	10
7003 D7	P1F03L6	IgL2V2-18*02	95,8	IgL2J3*02	94,4	8(9)	10
7003 D7	P1G05L2	IgL2V3-9*01	95,7	IgL2J3*02	94,4	5(6)	9
7003 D7	P1H09L2	IgL2V2-14*01	94,1	IgL2J2*01	84,2	11(12)	9
7003 D7	P1H10L1	IgL2V1-44*01	96,5	IgL2J3*02	97,1	10	11
7003 D14	P1A03K2	IgKV3-15*01	92,1	IgKJ2*01	92,3	13	11
7003 D14	P1A12L1	IgL2V1-40*01	95,5	IgL2J2*01	94,4	7(8)	10
7003 D14	P1B02L1	IgL2V1-40*01	91,9	IgL2J1*01	86,8	16(17)	12
7003 D14	P1B04L4	IgL2V2-23*01	94,4	IgL2J3*02	91,7	11(12)	10
7003 D14	P1B12L1	IgL2V6-57*01	91,8	IgL2J2*01	89,5	14	11
7003 D14	P1C05L2	IgL2V1-47*01	97,9	IgL2J2*01	97,4	4	11
7003 D14	P1C06L1	IgL2V2-14*01	96,5	IgL2J2*01	97,4	7(8)	11
7003 D14	P1C11K1	IgKV1-5*03	90,7	IgKJ4*01	92,1	14	10
7003 D14	P1E02L7	IgL2V1-40*01	92	IgL2J2*01	89,5	14	12
7003 D14	P1E03L1	IgL2V1-47*01	98,9	IgL2J3*02	94,7	2	11
7003 D14	P1E06L3	IgL2V1-40*01	91,7	IgL2J2*01	86,8	15(16)	14
7003 D14	P1F07K1	IgKV1-9*01	95,3	IgKJ4*01	94,7	7	9
7003 D14	P1G04L1	IgL2V1-40*01	93,4	IgL2J1*01	88,9	14	11
7003 D14	P1G08L6	IgL2V2-14*01	94,1	IgL2J1*01	97,2	11(12)	10
7003 D14	P1G12K1	IgKV1-27*01	93,2	IgKJ2*01	94,7	11	9
7006 D7	P1B06K4	IgKV3-11*01	94,3	IgKJ3*01	94,7	7	9
7006 D7	P1D07L3	IgL2V2-11*01	90,7	IgL2J1*01	97,2	12(13)	10
7006 D7	P1E02K2	IgKV2-30*01	95,3	IgKJ1*01	97,4	6	9
7006 D7	P1F09K2	IgKV1-5*03	95,5	IgKJ2*03	84,9	5(6)	8
7006 D7	P1G02K2	IgKV3-11*01	89,1	IgKJ4*01	78,4	9	9

7006 D7	P1H07K1	IgKV1-5*03	96,9	IgKJ1*01	87,5	2(3)	9
7006 D7	P2A05K2	IgKV1-5*03	93,8	IgKJ1*01	85,5	5(6)	8
7006 D7	P2A12K8	IgKV3-11*01	90,3	IgKJ4*01	91,7	13	9
7006 D7	P2B07K6	IgKV3-15*01	93,8	IgKJ4*01	95,2	12	10
7006 D7	P2C05K6	IgKV1-17*01	98,6	IgKJ4*01	92,1	9	9
7006 D7	P2D04K3	IgKV1-39*01	94	IgKJ1*01	94,1	8	9
7006 D7	P2D12L1	IgL2-11*01	95	IgLJ2*01	100	3(4)	10
7006 D7	P2E03K4	IgKV1-39*01	97,5	IgKJ2*01	90,2	8	9
7006 D7	P2F09K1	IgKV4-1*01	95,8	IgKJ1*01	86,8	16(17)	8
7006 D7	P2G11K2	IgKV3-20*01	91,7	IgKJ2*01	81,3	10(11)	10
7006 D7	P2H02K2	IgKV1-5*03	86,8	IgKJ1*01	83,3	10(13)	9
7006 D14	P1A11K2	IgKV3-15*01	95	IgKJ3*01	94,7	14(15)	10
7006 D14	P1G09K3	IgKV3-11*01	90,3	IgKJ1*01	91,7	7(8)	9
7006 D14	P1G12K4	IgKV1-33*01	95	IgKJ4*01	89,5	10(11)	9
7006 D14	P1H09K2	IgKV2-28*01	98,6	IgKJ3*01	92,1	3	10
1002 D6	P1A02 K1	IgKV2-28*01	95,2	IgKJ2*03	92,1	8	9
1002 D6	P1A05 K1	IgKV2-28*01	90,5	IgKJ3*01	89,2	14	9
1002 D6	P1A06 L1	IgL2-1*01	95,3	IgLJ1*01	94,6	8(9)	9
1002 D6	P1A07 K1	IgKV3-20*01	98,6	IgKJ2*03	92,1	2	10
1002 D6	P1A10 K1	IgKV4-1*01	95,6	IgKJ2*01	100	10	9
1002 D6	P1A11 K1	IgKV1-17*01	93,6	IgKJ2*01	100	11	9
1002 D6	P1A12 L3	IgL2-47*01	93,7	IgLJ3*02	97,4	12	12
1002 D6	P1B02 L2	IgL2-8*01	100	IgLJ1*01	100	2	9
1002 D6	P1B03 K3	IgKV1-5*03	95,3	IgKJ1*01	94,7	6	9
1002 D6	P1B04 L5	IgL2-51*01	96,8	IgLJ3*02	94,6	4	11
1002 D6	P1B08 K1	IgKV3-15*01	95,3	IgKJ4*01	97,4	8	11
1002 D6	P1B10 K1	IgKV3-15*01	97,8	IgKJ1*01	89,5	5	9
1002 D6	P1B11 L1	IgL2-36*01	97,9	IgLJ2*01	100	4	11
1002 D6	P1B12 L1	IgL2-1*01	99,3	IgLJ1*01	100	1(2)	10
1002 D6	P1C04 L1	IgL2-57*02	94,5	IgLJ2*01	89,5	9	10
1002 D6	P1C05 L2	IgL2-14*01	95,1	IgLJ3*02	97,1	9	10
1002 D6	P1C06 L3	IgL2-14*01	98,6	IgLJ3*02	100	3(4)	10
1002 D6	P1C07 K1	IgKV3-15*01	97,8	IgKJ3*01	94,7	4	9
1002 D6	P1C09 K1	IgKV4-1*01	98,7	IgKJ4*01	97,4	2	10
1002 D6	P1C11 L1	IgL2-51*01	92,6	IgLJ2*01	89,5	11	11
1002 D6	P1D02 L1	IgL2-8*01	99,3	IgLJ1*01	86,8	1(3)	10
1002 D6	P1D05 K1	IgKV1-27*01	93,6	IgKJ4*01	100	11	9
1002 D6	P1E03 L3	IgL2-25*03	100	IgLJ2*01	94,7	0	11
1002 D6	P1E07 K4	IgKV1-39*01	94,6	IgKJ4*01	94,7	10(11)	10

1002 D6	P1E08 K2	IgKV1-39*01	93,9	IgKJ2*02	94,7	12	10
1002 D6	P1E10 K1	IgKV1-12*01	82,8	IgKJ5*01	97,4	22	9
1002 D6	P1F02 L5	IgLV2-23*02	96,9	IgLJ3*02	94,7	8(9)	11
1002 D6	P1F03 L6	IgLV2-8*01	98,3	IgLJ3*02	94,7	6(7)	11
1002 D6	P1F05 K1	IgKV4-1*01	98,7	IgKJ4*01	97,4	2	10
1002 D6	P1F07 K1	IgKV1-39*01	93,2	IgKJ2*03	100	13	9
1002 D6	P1F08 K3	IgKV3-15*01	96,1	IgKJ4*01	97,1	8	8
1002 D6	P1F12 L6	IgLV3-25*03	96,8	IgLJ2*01	97,4	4	11
1002 D6	P1G03 K2	IgKV1-39*01	96,8	IgKJ1*01	91,7	4	9
1002 D6	P1G07 K1	IgKV4-1*01	98	IgKJ4*01	97,4	3	10
1002 D6	P1G08 K1	IgKV3-20*01	93,6	IgKJ4*01	97,4	10	9
1002 D6	P1G09 L1	IgLV1-51*01	98,6	IgLJ1*01	100	3(4)	11
1002 D6	P1G11 K1	IgKV3-15*01	98,6	IgKJ4*01	94,7	2	11
1002 D6	P1G12 L1	IgLV2-8*01	98,6	IgLJ2*01	92,1	3(4)	12
1002 D6	P1H03 L1	IgLV3-21*02	93,9	IgLJ3*02	100	13	11
1002 D6	P1H06 L4	IgLV2-8*01	97,6	IgLJ2*01	100	6(7)	10
1002 D6	P1H07 K1	IgKV2-28*01	99,3	IgKJ1*01	94,7	0(1)	8
1002 D6	P1H08 L1	IgLV1-40*01	96,2	IgLJ3*02	97,2	7	11
1002 D6	P1H09 K1	IgKV1-39*01	96,4	IgKJ5*01	100	7(9)	8
1002 D6	P1H12 K1	IgKV4-1*01	99	IgKJ1*01	94,6	2	9
1002 D14	P1A04L2	IgLV2-23*02	99,3	IgLJ3*02	100,0	1(2)	10
1002 D14	P1A06L2	IgLV3-21*02	94,3	IgLJ2*01	94,7	12	12
1002 D14	P1A07K1	IgKV4-1*01	99,3	IgKJ1*01	89,5	1	9
1002 D14	P1A08K1	IgKV4-1*01	99,7	IgKJ1*01	89,5	1	9
1002 D14	P1A10L6	IgLV3-1*01	98,9	IgLJ3*02	94,7	0(3)	8
1002 D14	P1A12L1	IgLV3-10*01	96,8	IgLJ2*01	92,1	3	12
1002 D14	P1B04K1	IgKV3-20*01	99,3	IgKJ1*01	89,5	1	9
1002 D14	P1B05L1	IgLV3-21*02	99,3	IgLJ2*01	100,0	1	11
1002 D14	P1B06K2	IgKV1-39*01	99,3	IgKJ1*01	94,7	2(3)	9
1002 D14	P1B07L3	IgLV3-25*03	97,8	IgLJ2*01	91,9	2	9
1002 D14	P1B09K2	IgKV3-15*01	94,6	IgKJ1*01	97,4	12	9
1002 D14	P1B10K1	IgKV3-20*01	100,0	IgKJ3*01	97,4	5(6)	8
1002 D14	P1B10L2	IgLV6-57*02	97,9	IgLJ3*02	97,3	0	10
1002 D14	P1C02K1	IgKV4-1*01	99,0	IgKJ1*01	94,7	1(2)	9
1002 D14	P1C04K1	IgKV2-28*01	95,9	IgKJ2*01	97,4	8	11
1002 D14	P1C08L1	IgLV3-1*01	97,5	IgLJ2*01	100,0	4(5)	9
1002 D14	P1C12L2	IgLV1-36*01	99,7	IgLJ2*01	100,0	0	11
1002 D14	P1D02L2	IgLV3-1*01	99,6	IgLJ3*02	97,4	0(1)	9
1002 D14	P1D03K2	IgKV1-17*01	97,1	IgKJ1*01	97,3	4	9

1002 D14	P1D04L1	IgLV7-46*01	98,3	IgLJ2*01	83,8	2	10
1002 D14	P1D06L1	IgLV2-8*01	96,5	IgLJ3*02	100,0	9(10)	10
1002 D14	P1D10L1	IgLV1-44*01	97,2	IgLJ3*02	100,0	7	12
1002 D14	P1D11K2	IgKV3-11*01	98,9	IgKJ5*01	94,7	2(3)	10
1002 D14	P1D12L1	IgLV1-44*01	98,6	IgLJ3*02	97,2	4	11
1002 D14	P1D12L1	IgLV1-44*01	98,6	IgLJ3*02	97,2	4	11
1002 D14	P1E02L1	IgLV3-1*01	97,8	IgLJ1*01	100,0	3(4)	9
1002 D14	P1E03L1	IgLV2-11*01	97,2	IgLJ3*02	100,0	5(6)	10
1002 D14	P1E04L1	IgLV2-11*01	96,5	IgLJ3*02	100,0	6(7)	10
1002 D14	P1E05K1	IgKV3-20*01	96,1	IgKJ2*03	92,3	9(10)	9
1002 D14	P1E06K2	IgKV4-1*01	98,7	IgKJ1*01	92,1	3	9
1002 D14	P1E10L1	IgLV3-25*03	99,3	IgLJ2*01	100,0	1	11
1002 D14	P1E11L1	IgLV3-25*03	99,3	IgLJ2*01	100,0	0	11
1002 D14	P1F04K1	IgKV1-27*01	93,9	IgKJ1*01	89,5	14	9
1002 D14	P1F05L1	IgLV3-21*02	96,4	IgLJ3*02	94,6	8	11
1002 D14	P1F06K1	IgKV1-5*03	100,0	IgKJ2*01	94,9	0(1)	9
1002 D14	P1F07K1	IgKV1-9*01	97,1	IgKJ3*01	89,5	4(5)	9
1002 D14	P1F09L2	IgLV3-1*01	97,8	IgLJ3*02	97,3	3	10
1002 D14	P1F10K1	IgKV1-5*03	96,4	IgKJ1*01	94,3	4	8
1002 D14	P1F11L1	IgLV3-25*03	97,1	IgLJ3*02	92,1	3	11
1002 D14	P1G03K1	IgKV3-11*01	92,5	IgKJ4*01	97,2	12	9
1002 D14	P1G04K1	IgKV1-5*03	95,0	IgKJ1*01	97,2	8(9)	8
1002 D14	P1G05K1	IgKV1-39*01	96,4	IgKJ3*01	94,6	6	9
1002 D14	P1G06L1	IgLV2-23*02	95,5	IgLJ3*02	94,7	10(11)	11
1002 D14	P1G10K1	IgKV4-1*01	97,0	IgKJ3*01	91,7	7	9
1002 D14	P1G11L2	IgLV1-51*01	98,9	IgLJ3*02	94,7	0	12
1002 D14	P1G12L1	IgLV3-25*03	99,6	IgLJ3*02	100,0	1	11
1002 D14	P1H02K1	IgKV4-1*01	96,6	IgKJ3*01	91,7	9	9
1002 D14	P1H03K2	IgKV1-9*01	100,0	IgKJ5*01	97,0	0	8
1002 D14	P1H04K2	IgKV1-9*01	100,0	IgKJ1*01	97,1	0	9
1002 D14	P1H06K1	IgKV3-20*01	97,9	IgKJ4*01	100,0	5	9
1002 D14	P1H08K7	IgKV1-9*01	99,6	IgKJ2*01	100,0	1	11
1002 D14	P1H09K5	IgKV3-20*01	86,9	IgKJ3*01	97,4	19(22)	8
1002 D14	P1H11L1	IgLV7-46*01	90,3	IgLJ2*01	88,2	15	9
1008 D12	P1A03L1	IgLV2-14*01	98,6	IgLJ1*01	94,4	2(3)	10
1008 D12	P1A04L2	IgLV3-27*01	98,2	IgLJ2*01	91,7	2	9
1008 D12	P1A06K1	IgKV1-39*01	90,7	IgKJ3*01	100,0	13	9
1008 D12	P1A08L1	IgLV3-27*01	98,6	IgLJ2*01	91,7	2	9
1008 D12	P1A10L4	IgLV1-51*01	98,9	IgLJ2*01	92,1	1	12

1008 D12	P1B02L1	IgLV1-51*01	98,3	IgLJ1*01	97,4	4	12
1008 D12	P1B04K1	IgKV1-39*01	99,3	IgKJ4*01	92,1	2	10
1008 D12	P1B06K2	IgKV1D-37*01	99,6	IgKJ4*01	86,8	1	10
1008 D12	P1B09L1	IgLV3-10*01	96,4	IgLJ3*02	91,9	7	11
1008 D12	P1B10L2	IgLV3-25*03	100,0	IgLJ2*01	100,0	0	11
1008 D12	P1C02K1	IgKV1-39*01	97,5	IgKJ1*01	100,0	5	9
1008 D12	P1C03L1	IgLV1-44*01	93,0	IgLJ3*02	94,4	10	11
1008 D12	P1C04K1	IgKV3-20*01	98,2	IgKJ2*01	92,3	3	10
1008 D12	P1C05L1	IgLV1-40*01	96,9	IgLJ3*02	92,1	7	12
1008 D12	P1C06L1	IgLV3-25*03	99,3	IgLJ3*02	100,0	1	10
1008 D12	P1C07K1	IgKV2-30*02	92,2	IgKJ1*01	97,2	17	9
1008 D12	P1C09L2	IgLV1-40*01	97,6	IgLJ2*01	97,1	5	11
1008 D12	P1C11K4	IgKV1-9*01	95,7	IgKJ5*01	97,4	4(7)	6
1008 D12	P1C12K1	IgKV4-1*01	99,0	IgKJ1*01	94,7	2	9
1008 D12	P1D03L1	IgLV1-40*01	98,3	IgLJ2*01	97,1	3	11
1008 D12	P1D04L1	IgLV1-51*01	99,7	IgLJ2*01	100,0	0	12
1008 D12	P1D05L1	IgLV3-25*03	100,0	IgLJ2*01	100,0	0	10
1008 D12	P1D06K1	IgKV4-1*01	100,0	IgKJ1*01	92,1	0	9
1008 D12	P1D10L1	IgLV3-1*01	100,0	IgLJ2*01	97,2	0(1)	9
1008 D12	P1D11L1	IgLV3-25*03	97,5	IgLJ3*02	94,7	3	11
1008 D12	P1E02K1	IgKV2-30*02	96,6	IgKJ1*01	94,7	5	10
1008 D12	P1E05L1	IgLV3-25*03	98,9	IgLJ3*02	94,7	1	11
1008 D12	P1E06K2	IgKV1-39*01,	91,0	IgKJ1*01	89,2	14	9
1008 D12	P1E07K1	IgKV3-15*01	93,2	IgKJ2*01	97,4	11	9
1014 D6	P1A02K1	IgKV3-11*01	98,2	IgKJ1*01	91,9	2	9
1014 D6	P1A03K1	IgKV1-27*01	96,1	IgKJ2*01	92,1	6	9
1014 D6	P1A04K2	IgKV3-20*01	93,6	IgKJ4*01	86,5	11(12)	8
1014 D6	P1A06L1	IgLV3-25*03	96,1	IgLJ2*01	94,7	7(8)	10
1014 D6	P1A07L1	IgLV3-1*01	97,8	IgLJ1*01	100,0	3(4)	10
1014 D6	P1A10L1	IgLV2-14*01	99,3	IgLJ2*01	100,0	1	12
1014 D6	P1B02K1	IgKV1-12*01	99,6	IgKJ3*01	92,1	1	9
1014 D6	P1B03K1	IgKV3-20*01	97,5	IgKJ1*01	97,4	5(6)	10
1014 D6	P1B05K1	IgKV1-39*01	93,9	IgKJ3*01	94,7	10	9
1014 D6	P1B07K1	IgKV3D-15*01	98,9	IgKJ4*01	94,7	1	12
1014 D6	P1B07L1	IgLV2-14*01	94,1	IgLJ2*01	94,7	12(14)	10
1014 D6	P1B09L3	IgLV2-18*02	98,6	IgLJ1*01	97,4	2(4)	10
1014 D6	P1C02L1	IgLV1-44*01	99,7	IgLJ2*01	100,0	0	11
1014 D6	P1C03K1	IgKV3-15*01	98,6	IgKJ5*01	97,4	2(4)	9
1014 D6	P1C04K1	IgKV4-1*01	99,3	IgKJ2*01	100,0	2	9

1014 D6	P1C08K1	IgKV3-20*01	97,5	IgKJ5*01	100,0	4(5)	8
1014 D6	P1C09K1	IgKV4-1*01	100,0	IgKJ1*01	100,0	0	9
1014 D6	P1C12K1	IgKV1-5*03	99,6	IgKJ1*01	94,7	1	9
1014 D6	P1D04K2	IgKV3-20*01	95,0	IgKJ1*01	92,1	11	9
1014 D6	P1D06K4	IgKV3-20*01	91,5	IgKJ1*01	92,1	10	10
1014 D6	P1D06L1	IgLV1-51*02	99,7	IgLJ2*01	100,0	0	10
1014 D6	P1D07L1	IgLV3-1*01	100,0	IgLJ1*01	94,7	0(1)	9
1014 D6	P1D08K1	IgKV1-5*03	99,3	IgKJ2*01	100,0	2	9
1014 D6	P1D09K1	IgKV1-5*03	99,3	IgKJ3*01	100,0	3	7
1014 D6	P1D12K2	IgKV1-39*01	95,7	IgKJ2*01	97,4	9	10
1014 D6	P1E02K1	IgKV2-24*01	94,2	IgKJ2*01	100,0	10	9
1014 D6	P1E04K1	IgKV3-20*01	97,5	IgKJ1*01	100,0	5(6)	10
1014 D6	P1E06K1	IgKV1D-12*01	96,8	IgKJ3*01	97,4	5	10
1014 D6	P1E09K1	IgKV3-20*01	97,9	IgKJ1*01	89,2	4	9
1014 D6	P1E12K1	IgKV2-28*01	99,7	IgKJ4*01	97,4	1	9
1014 D6	P1F02L1	IgLV1-47*02	99,3	IgLJ2*01	100,0	1	11
1023 D6	P1A02K1	IgKV3-20*01	98,9	IgKJ2*01	100	2	9
1023 D6	P1A07L1	IgLV9-49*01	96,6	IgLJ1*01	100	5(8)	12
1023 D6	P1A08K1	IgKV3-11*01	96,1	IgKJ1*01	94,3	7	8
1023 D6	P1A10L1	IgLV3-1*01	91	IgLJ2*01	88,9	14(15)	9
1023 D6	P1A11K1	IgKV2-30*02	96,6	IgKJ1*01	89,5	6	10
1023 D6	P1A12L1	IgLV3-1*01	92,8	IgLJ2*01	92,1	17(18)	11
1023 D6	P1B02K1	IgKV1-12*01	99,6	IgKJ4*01	94,7	0	10
1023 D6	P1B03L1	IgLV2-23*01	97,6	IgLJ2*01	97,4	3(5)	10
1023 D6	P1B04L1	IgLV1-40*01	96,2	IgLJ1*01	92,1	10	12
1023 D6	P1B07K1	IgKV3-20*01	96,4	IgKJ1*01	94,7	7(8)	9
1023 D6	P1B08K1	IgKV3-15*01	92,8	IgKJ1*01	89,5	12	10
1023 D6	P1B09L1	IgLV1-40*01	92,4	IgLJ1*01	89,5	15	12
1023 D6	P1B10K1	IgKV1-39*01	94,3	IgKJ2*01	97,4	9	9
1023 D6	P1B11K1	IgKV3-20*01	96,8	IgKJ1*01	94,7	4	9
1023 D6	P1B12K1	IgKV1-5*03	92,5	IgKJ2*01	97,4	10(12)	9
1023 D6	P1C02K1	IgKV1-5*03	92,1	IgKJ2*01	91,7	15	9
1023 D6	P1C03L3	IgLV1-40*01	95,5	IgLJ2*01	100	9	12
1023 D6	P1C04K1	IgKV4-1*01	94,9	IgKJ2*01	94,7	7	10
1023 D6	P1C05K1	IgKV3-11*01	98,9	IgKJ4*01	97,1	2	8
1023 D6	P1C06K1	IgKV3-15*01	92,8	IgKJ4*01	97,4	10	11
1023 D6	P1C07K1	IgKV3-20*01	94,7	IgKJ1*01	100	5(6)	9
1023 D6	P1C09K1	IgKV3-15*01	94,3	IgKJ1*01	88,9	10	9
1023 D6	P1C10K1	IgKV1-5*03	97,1	IgKJ1*01	86,8	7(8)	9

1023 D6	P1C11L1	IgLV2-23*02	96,9	IgLJ1*01	86,8	6(8)	8
1023 D6	P1C12K1	IgKV3-11*01	90,3	IgKJ2*02	97,2	13	9
1023 D6	P1D02L1	IgLV1-47*01	94,4	IgLJ2*01	81,1	10	11
1023 D6	P1D04L1	IgLV1-40*01	94,8	IgLJ1*01	86,8	11	12
1023 D6	P1D05L2	IgLV1-40*01	94,1	IgLJ2*01	94,7	13	11
1023 D6	P1D06K1	IgKV1-5*03	93,2	IgKJ2*01	94,4	10	9
1023 D6	P1D07K1	IgKV3-15*01	92,8	IgKJ4*01	97,4	11	11
1028 D6	P1A05K3	IgKV1-39*01	96,1	IgKJ3*01	89,5	7	9
1028 D6	P1A06L1	IgLV2-14*01	93,1	IgLJ1*01	89,5	13(14)	10
1028 D6	P1A07L1	IgLV6-57*01	94,2	IgLJ3*02	94,7	9(10)	10
1028 D6	P1A11L4	IgLV3-19*01	93,2	IgLJ2*01	94,6	14	11
1028 D6	P1B02K3	IgKV2-28*01	95,9	IgKJ5*01	97,3	9	9
1028 D6	P1B03K2	IgKV1-39*01	95,3	IgKJ1*01	86,5	8	9
1028 D6	P1B05L1	IgLV1-51*01	93,3	IgLJ2*01	85,7	11	11
1028 D6	P1B08K8	IgKV1-9*01	96,4	IgKJ2*01	100,0	13	9
1028 D6	P1B12L3	IgLV6-57*01	96,1	IgLJ3*02	94,7	3(4)	10
1028 D6	P1C04K1	IgKV1-17*01	98,9	IgKJ2*01	100,0	1	9
1028 D6	P1C08K6	IgKV4-1*01	94,8	IgKJ1*01	94,4	10	9
1028 D6	P1C10L3	IgLV6-57*01	96,2	IgLJ3*02	94,7	6(7)	10
1028 D6	P1C12K7	IgKV3-20*01	91,5	IgKJ2*02	92,1	15	9
1028 D6	P1D03L8	IgLV6-57*01	94,5	IgLJ3*02	94,7	10(11)	10
1028 D6	P1D05L1	IgLV2-8*01	96,9	IgLJ2*01	94,6	8(9)	10
1028 D6	P1D09L1	IgLV1-40*01	96,5	IgLJ1*01	100,0	7	11
1028 D6	P1E02K5	IgKV1-5*03	96,8	IgKJ2*01	97,4	8	10
1028 D6	P1E04L1	IgLV1-51*01	94,7	IgLJ1*01	94,7	10	12
1028 D6	P1E08L1	IgLV9-49*01	97,0	IgLJ2*01	97,2	7(8)	13
1028 D6	P1E10K7	IgKV1-16*01	95,3	IgKJ2*02	97,2	9	9
1028 D6	P1E11L1	IgLV2-14*01	89,9	IgLJ3*02	92,1	21(22)	11
1028 D6	P1F02L2	IgLV6-57*01	93,9	IgLJ3*02	94,7	6(7)	10
1028 D6	P1F05K3	IgKV2-28*01	94,9	IgKJ3*01	91,9	9	9
1028 D6	P1F06K7	IgKV3-20*01	96,8	IgKJ4*01	97,2	5	9
1028 D6	P1F09L1	IgLV3-25*03	91,4	IgLJ1*01	94,7	14	10
1028 D6	P1F11K7	IgKV4-1*01	96,0	IgKJ1*01	92,1	7(8)	9
1028 D6	P1F12K7	IgKV3-11*01	95,7	IgKJ4*01	100,0	4	10
1028 D6	P1G02L1	IgLV2-14*01	94,1	IgLJ2*01	94,6	13(14)	10
1028 D6	P1G04K7	IgKV1-33*01	90,7	IgKJ4*01	92,1	14(15)	9
1028 D6	P1G06L1	IgLV1-47*01	94,7	IgLJ3*02	89,5	12	11
1028 D6	P1G08L1	IgLV2-14*01	96,2	IgLJ2*01	94,7	8(12)	9
1028 D6	P1G10L1	IgLV2-8*01	93,1	IgLJ2*01	97,1	12	10

1028 D6	P1G11K5	IgKV3-20*01	91,8	IgKJ4*01	97,2	10	9
1028 D6	P1G12L1	IgLV3-27*01	92,8	IgLJ3*02	94,6	12	9
1028 D6	P1H03L3	IgLV6-57*01	96,2	IgLJ3*02	94,7	6(7)	10
1028 D6	P1H06L2	IgLV2-14*01	93,8	IgLJ2*01	89,5	15(16)	11
1028 D6	P1H07L1	IgLV2-14*01	91,7	IgLJ1*01	94,6	14	11
1028 D6	P1H11L2	IgLV6-57*01	96,2	IgLJ3*02	94,7	6(7)	10

8 REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- Akondy RS, et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol* 2009; v183; 11:7919–7930.
- Barret ADT. Molecular epidemiology of yellow fever virus. *Rev Biomed* 2010; v21;3:213-220.
- Barrett AD, Teuwen DE. Yellow fever vaccine — how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr Opin Immunol* 2009; v21;3:308-13.
- Barrett AD. Yellow Fever in Angola and Beyond – the Problem of Vaccine Supply and Demand. *N Engl J Med* 2016;v375;4:301-3.
- Beltramello M, et al. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* 2010;v8;3:271-83.
- Berman JE, Freferick W. Human Heavy Chain Variable Region Gene Diversity, Organization, and Expression. *Alt Inter Rev Immunol* 1990;5:203-214.
- Bethke N. Characterisation of the immune response after yellow fever vaccination. Berlin. Dissertação [Doutorado em Medicina] - Universitätsmedizin Berlin 2011.
- Brandiss MW, et al. Lethal 17D yellow fever encephalitis in mice – Passive protection by monoclonal antibodies to the envelope proteins of 17D and dengue 2 viruses. *J Gen Virol* 1986;67:229–234.
- Boyd SD, Joshi SA. High-Throughput DNA Sequencing Analysis of Antibody Repertoires. *Microbiol Espectr* 2014;v1;5.
- Campi-Azevedo AC, et al. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. *BMC Infect Dis* 2014;v14;1.
- Chen LH, Hamer DH. Vaccination Challenges in Confronting the Resurgent Threat From Yellow Fever. *JAMA* 2017;v7;318:1651-1652.

Chen LH, Kozarsky PE, Visser LG. What's old is new again: the re-emergence of yellow fever in Brazil and vaccine shortages. *Clin Infect Dis* 2018.

Cleton N, et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *J Clin Virol* 2012;v55;3:191-203.

Corti D, et al. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1- infected individuals. *PLoS One* 2010;v5;1:e8805.

Daffis S, et al. Antibody responses against wild-type yellow fever virus and the 17D vaccine strain: characterization with human monoclonal antibody fragments and neutralization escape variants. *Virology* 2005;v337;2:262-72.

Brasil. Decreto nº 47.126, de 12 de janeiro de 2017. Altera o Decreto nº 44.525, de 1 de maio de 2007, que cria o Comitê Interinstitucional de Recuperação de Ativos – CIRA – e dá outras providências. Diário do Executivo. Minas Gerais, 13 jan 2017;v125;9:1-1.

Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annu Rev Biochem* 2007;v76;1:1–22.

DeKosky BJ, et al. High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. *Nat Biotechnol* 2013;v31;2:166-9.

Douam F, Ploss A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol* 2018;v26;11:913-928.

Dowd KA, Pierson TC. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: A reductionist view. *Virology* 2011;v411;2:306–315.

Eberwine J, et al. The promise of single-cell sequencing. *Nat Methods* 2014;v11;1:25-7.

Ferreira KV, et al. Histórico da febre amarela no Brasil e a importância da vacinação antiamarílica. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde* 2011;v36;1:40-47.

Fink K. Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Front Immunol* 2012;v3;78.

Frierson JG. The yellow fever vaccine: a history. *Yale J Biol Med* 2010;v83;2:77-85.

- Fuertes Marraco SA, et al. Long-lasting stem cell-like memory CD8⁺ T cells with a naïve-like profile upon yellow fever vaccination. *Sci Transl Med* 2015;v7;282.
- Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Impactos na saúde e no sistema único de saúde decorrente de agravos relacionados a um saneamento ambiental inadequado. 2010;246:il.
- Galson JD, et al. Studying the antibody repertoire after vaccination: practical applications. *Trends Immunol* 2014;v35;7:319-31.
- Gaucher D, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med* 2008;v205;13:3119-31.
- Georgiou G, et al. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol* 2014;v32;2:158-68.
- Godoy-Lozano EE, et al. Lower IgG somatic hypermutation rates during acute dengue virus infection is compatible with a germinal center-independent B cell response. *Genome Med* 2016;v8;1:23.
- Gould EA, et al. Neutralizing (54k) and non-neutralizing (54k and 48k) monoclonal antibodies and nonstructural yellow fever virus proteins confer immunity in mice. *J Gen Virol* 1986;67:592–595.
- Brasil. GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Notificação de febre amarela silvestre em macacos. Comunicado – Sistema Ambiental Paulista. São Paulo, dezembro de 2016.
- Brasil. GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Boletim Epidemiológico Febre Amarela de 23/10/2018. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/fa18_boletim_epid_2310.pdf Acesso em 26 fev 2018.
- Brasil. GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Boletim Epidemiológico Febre Amarela de 28/12/2018. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/fa18_boletim_epid_2812.pdf. Acesso em 26 fev 2018a.
- Halstead SB, Thomas SJ. New vaccines for Japanese encephalitis. *Curr Infect Dis Rep* 2010;v12;3:174-80.

- Heinz FX, et al. Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* 2007;v25;43:7559-67.
- Higgs S. Yellow Fever Virus: Cause for Concern or Alarm? *Vector Borne Zoonotic Dis* 2016;v16;8:499-500.
- Johnston LJ, Halliday GM, King NJ. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J Invest Dermatol* 2000;v114;3:560-8.
- Johnson PR, et al. Vector-mediated gene transfer engenders long-lived neutralizing activity and protection against SIV infection in monkeys. *Nat Med* 2009;v15;8:901-6.
- 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;v29;35:6008-16.
- Kallás EG, et al. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2019;v19;7:750-758.
- Kraemer MU, et al. Spread of yellow fever virus outbreak in Angola and the Democratic Republic of the Congo 2015–16: a modelling study. *Lancet Infect Dis* 2016;v17;3:330-338.
- Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005;v5;4:251-62.
- Libraty DH, et al. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol* 2001;v75;8:3501-8.
- Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003;59:23-61.
- Magnani DM, et al. Potent Plasmablast-Derived Antibodies Elicited by the National Institutes of Health Dengue Vaccine. *J Virol* 2017;v91;22:e00867-17.
- Magnani DM, et al. A human inferred germline antibody binds to an immunodominant epitope and neutralizes Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis* 2017a;v11;6:e0005655.
- Martins MA, et al. Activation/modulation of adaptive immunity emerges simultaneously after 17DD yellow fever first-time vaccination: is this the key to

prevent severe adverse reactions following immunization? *Clin Exp Immunol* 2007;v148;1:90-100.

Martins RM, et al. 17DD yellow fever vaccine: a double blind, randomized clinical trial of immunogenicity and safety on a dose-response study. *Hum Vaccin Immunother* 2013;v9;4:879–888.

McBride OW. Chromosomal location of human kappa and lambda immunoglobulin light chain constant region genes. *J Exp Med* 1982;v155;5:1480-90.

Miller JD, et al. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* 2008;v28;5:710-722.

Brasil. Ministério da Saúde. Febre amarela: histórico. [on-line]. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/historico.php>. Acesso em 4 jan 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva. Subsecretaria de Planejamento e Orçamento. Plano Nacional de Saúde – PNS: 2012-2015. 2011;114:il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

Brasil. Ministério da Saúde – Portal da Saúde. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2017/2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf>. Acesso em 26 fev 2018a.

Brasil. Ministério da Saúde – Secretaria de vigilância à saúde. Febre Amarela: Guia para profissionais de saúde. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/18/Guia-febre-amarela-2018.pdf>. Acesso em 08 ago 2018b.

Monath TP. Neutralizing antibody responses in the major immunoglobulin classes to yellow fever 17D vaccination of humans. *Am J Epidemiol* 1971;v93;2:122-9.

_____. Yellow fever: victor, Victoria? Conqueror, conquest? Epidemics and research in the last forty years and prospects for the future. *Am J Trop Med Hyg* 1991;v45;1:1-43.

_____. Yellow fever: An update. *Lancet Infect Dis* 2001;v1;1:11-20.

Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. *J Clin Virol* 2015;64:160-73.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 2005;v3;1:13–22.

Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's immunobiology*. 8. ed New York: Garland Science, 2012.

Niedrig M, Lademann M, Emmerich P, Lafrenz M. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Trop Med Int Health* 1999;v4;12:867-71.

Oettinger MA, et al. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990;v248;4962:1517-23.

Palucka AK. Dengue virus and dendritic cells. *Nat Med* 2000;v6;7:748-9.

PAHO - Pan American Health Organization; WHO - World Health Organization. Epidemiological Alert: Yellow Fever. 22 apr Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2016.

PAHO – Pan American Health Organization. Brazil launches world's largest campaign with fractional-dose yellow fever vaccine. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14065:brazil-launches-worlds-largest-campaign-with-fractional-dose-yellow-fever-vaccine&Itemid=135&lang=em. Acesso em 27 fev 2018.

Parameswaran P, et al. Convergent antibody signatures in human dengue. *Cell Host Microbe* 2013;v13;6:691-700.

Parren PW, Burton DR. The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv Immunol* 2001;77:195-262.

Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 2013;v131;4:959-71.

Poland JD, et al. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ* 1981;v59;6:895-900.

Priyamvada L, et al. B Cell Responses during Secondary Dengue Virus Infection Are Dominated by Highly Cross-Reactive, Memory-Derived Plasmablasts. *J Virol* 2016;v90;12:5574-85.

Quaresma JA, et al. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. *Virology* 2006a;345:22–30.

_____, et al. Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. *Virus Res* 2006b;v116;1-2:91-7.

_____, et al. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Rev Med Virol* 2013;v23;5:305-18.

Querec TD, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 2009;v10;1:116-125.

Ricciardi MJ, et al. Ontogeny of the B- and T-cell response in a primary Zika virus infection of a dengue-naïve individual during the 2016 outbreak in Miami, FL. *PLoS Neg Trop Dis* 2017;v11;12:e0006000.

Rogers DJ, et al. The Global Distribution of Yellow Fever and Dengue. *Adv Parasitol* 2006;62:181–220.

Santos-Torres S, et al. Estado imune contra o vírus vacinal (17D) da febre amarela em duas populações do Estado da Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;v33;1:39-46.

Sapparapu G, et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature* 2016;v540;7633:443-447.

Sasaki S, et al. Comparison of the influenza virus-specific effector and memory B-cell responses to immunization of children and adults with live attenuated or inactivated influenza virus vaccines. *J Virol* 2007;v81;1:215-228.

Sautto G, et al. Possible future monoclonal antibody (mAb)-based therapy against arbovirus infections. *Biomed Res Int* 2013;ID:838491.

Schlesinger JJ, et al. Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody. *J Gen Virol* 1990;v71;3:593-9.

Sok D, et al. The effects of somatic hypermutation on neutralization and binding in the PGT121 family of broadly neutralizing HIV antibodies. *PLoS Pathog* 2013;v9;11:e1003754.

- Solforsoli L, et al. A phage display vector optimized for the generation of human antibody combinatorial libraries and the molecular cloning of monoclonal antibody fragments. *New Microbiol* 2012;v35;3:289-94.
- Sundling C, et al. Single-cell and deep sequencing of IgG-switched macaque B cells reveal a diverse Ig repertoire following immunization. *J Immunol* 2014;v192;8:3637-44.
- Throsby M, et al. Isolation and characterization of human monoclonal antibodies from individuals infected with West Nile Virus. *J Virol* 2006;v80;14:6982-92.
- Tiller T, et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 2008;v329;1-2:112-24.
- Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;v302;14:575-581.
- Tsioris K, et al. Neutralizing antibodies against West Nile virus identified directly from human B cells by single-cell analysis and next generation sequencing. *Integr Biol (Camb)* 2015;v7;12:1587-1597.
- Vasconcelos PF. Febre amarela. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;v36;2:275-93.
- Vasconcelos PF, et al. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerg infect dis* 2004;v10;9:578–1584.
- Verma R, Khanna P, Chawla S. Yellow fever vaccine: An effective vaccine for travelers. *Hum Vaccin Immunother* 2014;v10;1:126-8.
- Vratskikh O, et al. Dissection of Antibody Specificities Induced by Yellow Fever Vaccination. *PLoS Pathog* 2013;v9;6:e1003458.
- Walker LM, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 2009;v326;5950:285-9.
- Wardemann H, et al. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 2003;v301;5638:1374-1377.
- WHO - World Health Organization. Vaccines and vaccination against yellow fever. *Wkly Epidemiol Rec* 2013;v88;27:269-283.
- WHO - World Health Organization. Weekly Epidemiological Record. 2016a;32;v91:381-388.
- WHO - World Health Organization. Situation Report: Yellow Fever. 28 out 2016b.

WHO - World Health Organization. Yellow Fever – Nigeria. Disease outbreak news. 22 dez 2017a.

WHO - World Health Organization. Yellow fever vaccine: WHO position on the use of fractional doses. *Wkly Epidemiol Rec* 2017b;v92;25:345-356.

Wilson PC, Andrews SF. Tools to therapeutically harness the human antibody response. *Nat Rev Immunol* 2012;v12;10:709–719.

Wrammert J, et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J Exp Med* 2011;v208;1:181-193.

Wrammert J, et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. *J Virol* 2012;v86;6:2911-8.

Yasugi M, et al. Human monoclonal antibodies broadly neutralizing against influenza B virus. *PLoS Pathog* 2013;v9;2:e1003150.