

MARIANA PRADO MARMORATO

Investigação do envolvimento do baço na imunopatogênese da febre
amarela

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

SÃO PAULO

2023

MARIANA PRADO MARMORATO

**Investigação do envolvimento do baço na imunopatogênese da febre
amarela**

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

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

Programa de Pós-Graduação em Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

SÃO PAULO

2023

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
Investigação do envolvimento do baço na
imunopatogênese da febre amarela / Mariana Prado
Marmorato. -- São Paulo, 2023.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.Febre amarela 2.Baço 3.Imuno-
histoquímica 4.Células produtoras de anticorpos
5.Imunidade inata 6.Imunidade adaptativa

USP/FM/DBD-450/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Rejane e Francisco, pelo incentivo e apoio incondicional para que eu concluísse meus estudos na pós-graduação sem preocupações.

Por sempre estarem ao meu lado e acreditarem em mim e no meu potencial. Sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês infinitamente.

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, além de ser uma inspiração para mim no âmbito da pesquisa.

À Dra. Cássia G. Terrassani Silveira, pela orientação, por todos os ensinamentos passados, ajudas, palavras de conforto, risadas e choros e, por toda amizade. Você foi mais do que essencial para que este trabalho fosse realizado da melhor forma possível.

A todos do Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM-60) onde passei seis anos de minha vida:

À Dra. Juliana Dias por ser uma das pessoas mais especiais que eu poderia encontrar nesta jornada da pós-graduação, pelos incentivos, pelas palavras de conforto e pelas broncas, que alegraram meus dias infinitamente. Levarei sua amizade para a vida toda.

À Dra. Priscilla Costa por me acompanhar desde o início, passando todos os seus ensinamentos em citometria e me encaminhando a dar meus próprios passos na citometria, por me render muitas risadas com seu jeito especial e pelos seus “florzinha” que fizeram dos meus dias mais leves.

Carolina Argondizo e Mateus Thomazella pelo companheirismo na jornada em estudar a febre amarela, pelas intensas discussões, ajudas, incentivos e, sobretudo, pela amizade.

Thais Rezende, Ana Carolina Soares, Anne Ventura, Mônica Coelho, Victória Lunardelli e Luan Barbosa por toda ajuda, desde experimentos até discussões científicas e as não científicas também (especialmente as muitas risadas e momentos de gula). A companhia de vocês fez dos meus dias os melhores possíveis.

Ederson Xavier por toda solicitação de material respondida, pela amizade, todos os momentos de descontração e todos os chocolates e risadas, sempre alegrando meus dias.

Cândida Dantas, Issler Morais, Renan Carvalho, Beatriz Mourão e Ariane Cardoso por todo apoio em quesitos burocráticos, financeiros e ajudas em momentos de urgência.

Helena Tomiyama, Claudia Tomiyama, Aline Lumertz, Elisabeth Pereira, Raíssa Silva, Yasminne Mattos, Alberto Tomiyama, Eric Silvestre, Carlos Palma e Ruth

Bonadia por todo material solicitado, empréstimos temporários de equipamentos e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Eleni Arruda por toda tranquilidade em me passar todos os passos burocráticos da pós-graduação.

À Dra. Ana Maria Gonçalves da Silva pela colaboração em realizar as imuno-histoquímicas, pelos valiosos ensinamentos e pelas conversas produtivas. Este trabalho também é seu.

Ao Prof. Dr. Amaro Nunes Duarte Neto pela colaboração, ensinamentos, ajuda e discussões produtivas sobre o tema que me possibilitaram discutir os dados com mais clareza.

A todos responsáveis pelas coletas das amostras utilizadas neste projeto.

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

À Clarissa Bittencourt pela amizade, pelos momentos de distração, pelas risadas e desabafos, por todo incentivo e por acreditar no meu potencial e sempre ser paciente em me ouvir. Sua amizade foi essencial para atravessar os empecilhos da pós-graduação juntas, mesmo que distantes.

Aos meus pais, para os quais também dedico este trabalho, por serem os maiores incentivadores do meu ingresso na vida acadêmica, me acompanhando em todos os passos desde sempre.

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 pelo incentivo à pesquisa e financiamento.

EPÍGRAFE

“I understood that knowledge was a dwarfing, obliterating, all-consuming thing,
and to have it was to both be grateful and to suffer greatly”.

Carmen Maria Machado, *Her Body and Other Parties: Stories*

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborada por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valérica Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2012.

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver). Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento, Suely Campos Cardoso. 3ª ed. rev., ampl. e mod. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. FEBRE AMARELA	10
1.1.1. <i>O vírus e a patogênese</i>	<i>10</i>
1.1.2. <i>Epidemiologia</i>	<i>11</i>
1.1.3. <i>Diagnóstico</i>	<i>13</i>
1.1.4. <i>Tratamento</i>	<i>13</i>
1.1.5. <i>Vacina</i>	<i>14</i>
1.1.6. <i>Imunopatologia.....</i>	<i>15</i>
1.1.7. <i>O baço e a febre amarela.....</i>	<i>18</i>
1.2. JUSTIFICATIVA	22
2. OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVOS GERAIS	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. ASPECTOS ÉTICOS	28
3.2. CASUÍSTICA	28
3.2.1. <i>Casos de Febre Amarela.....</i>	<i>28</i>
3.2.2. <i>Controles</i>	<i>28</i>
3.4. AUTÓPSIA E COLETA DE AMOSTRAS, FIXAÇÃO, PROCESSAMENTO E INCLUSÃO EM PARAFINA PARA ANÁLISE SOB MICROSCOPIA DE LUZ.....	29
3.5. MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO	29
3.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA	32
3.6.1. <i>Análise quantitativa</i>	<i>32</i>
3.6.2. <i>Análise dos dados.....</i>	<i>34</i>
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. CASUÍSTICA	36
4.1.1. <i>Casos de febre amarela.....</i>	<i>36</i>
4.1.2. <i>Controles</i>	<i>37</i>
4.2. ANÁLISE DO RELATÓRIO ANATOMOPATOLÓGICO DO BAÇO DOS INDIVÍDUOS QUE FORAM A ÓBITO APÓS INFECCÃO PELO YFV	39
4.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES ESPLÊNICAS NOS GRUPOS ESPLENECTOMIA E FEBRE AMARELA	41
4.4. ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE <i>IN SITU</i> DO BAÇO	45
4.4.1. <i>Marcadores celulares comuns da resposta imune.....</i>	<i>45</i>
4.4.2. <i>Marcadores da resposta imune inata</i>	<i>48</i>
4.4.3. <i>Marcadores da imunidade adaptativa.....</i>	<i>51</i>
4.4.3.1. <i>Células T</i>	<i>51</i>
4.4.3.2. <i>Citocinas.....</i>	<i>54</i>
4.4.3.3. <i>Células B.....</i>	<i>57</i>
4.4.4. <i>Análise integrada dos dados.....</i>	<i>71</i>

5. CONCLUSÕES.....	78
6. ANEXOS	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da organização do genoma do YFV e da poliproteína codificada.....	10
Figura 2. Casos confirmados para febre amarela e informação de letalidade entre os anos de 1980 e 2018, atualizado em outubro de 2018.....	12
Figura 3. Representação esquemática da histologia de baço saudável.....	19
Figura 4. Cinética de expansão de ASC circulantes nos indivíduos com infecção natural pelo YFV (n=70).....	24
Figura 5. Cinética de expansão de plasmoblastos circulantes nos indivíduos com infecção natural pelo YFV (n=70).....	24
Figura 6. Cinética de expansão de plasmócitos circulantes nos indivíduos com infecção natural pelo YFV (n=70).....	25
Figura 7. Exemplo de determinação de área (μm^2) e contagem de marcador.....	33
Figura 8. Captura de tela representativa de planilha para cálculo de células por área (em mm^2).....	34
Figura 9. Fotomicrografia de baço imunomarcado para antígenos do YFV.....	41
Figura 10. Fotomicrografias de baço representativas dos grupos esplenectomia e febre amarela.....	42
Figura 11. Área total da polpa branca (mm^2)	43
Figura 12. Área da arteríola central (mm^2).....	44
Figura 13. Área da polpa branca após subtração da área da arteríola central (mm^2).....	44
Figura 14. Imunomarcção para CD45 e CD39.....	47
Figura 15. Imunomarcção para CD68 e NK.....	50
Figura 16. Imunomarcção para CD3 e Foxp3.....	53
Figura 17. Imunomarcção para IL10, IL12, IL33, IFN γ e receptor de IFN γ	56
Figura 18. Imunomarcção para CD20 e CXCR5.....	60
Figura 19. Imunomarcção para Bcl6, CD10 e CD23.....	64
Figura 20. Imunomarcção para CD138, CXCR4 e IgG.....	66
Figura 21. Distribuição de células CD138 ⁺ na polpa branca e polpa vermelha.....	69

- Figura 22. Correlograma dos dados clínicos, de citometria do sangue periférico e imuno-histoquímica do baço dos indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV (n = 24).....73
- Figura 23. Correlograma dos dados de imuno-histoquímica do baço dos indivíduos que passaram por esplenectomia pós-trauma (n = 10).....74
- Figura 24. Representação esquemática da resposta imune esperada durante um processo infeccioso.....75
- Figura 25. Representação esquemática da resposta imune desencadeada pelo YFV.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica e suas diluições correspondentes.....	31
Tabela 2. Descrição dos marcadores utilizados como anticorpos primários para a técnica de imuno-histoquímica.....	31
Tabela 3. Dados clínicos e demográficos dos indivíduos naturalmente infectados pelo YFV que foram a óbito (n=24).....	36
Tabela 4. Dados demográficos do grupo controle (n=10).....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AID	-	<i>Activation Induced Cytidine Deaminase</i>
ALT	-	Alanina aminotransferase
AST	-	Aspartato aminotransferase
ASC	-	<i>Antibody Secreting Cells</i>
BCR	-	<i>B Cell Receptor</i>
C	-	Capsídeo
CD	-	<i>Cluster of differentiation</i>
COVID-19	-	<i>Coronavirus Disease-19</i>
CXCR4	-	<i>Chemokine Receptor type 4</i>
CXCR5	-	<i>Chemokine Receptor type 5</i>
DENV	-	Vírus da Dengue
E	-	Envelope
ELISA	-	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FA	-	Febre Amarela
HC-FMUSP	-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	-	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IIER	-	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
IFN	-	<i>Interferon</i>
Ig	-	Imunoglobulina
IL	-	Interleucina
NK	-	<i>Célula Natural Killer</i>
NO	-	xido Ntrico
NS	-	<i>Non-structural</i>
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PALS	-	<i>Periarteriolar Lymphoid Sheaths</i>
PAMP	-	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	-	Tampão fosfato
PCR	-	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
prM	-	Precursor de Membrana
PRR	-	<i>Patter Recognition Receptors</i>
SHM	-	<i>Somatic Hypermutation</i>
SVOC-USP	-	Serviço de Verificação de óbitos da Capital da Universidade de São Paulo
TLR	-	<i>Toll-like receptor</i>

TNF	-	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
YFV	-	<i>Yellow Fever Virus</i>
ZIKV	-	Zika vírus

RESUMO

Marmorato MP. Investigação do envolvimento do baço na imunopatogênese da febre amarela [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Pós-graduação em Alergia e Imunopatologia, 2023.

A febre amarela é uma doença infecciosa que continua representando um problema de saúde pública no Brasil. No ano de 2018 foram confirmados 504 casos silvestres em humanos, com uma taxa de letalidade de 35% durante o surto que ocorreu no estado de São Paulo. A vacina contra o vírus da febre amarela (YFV) é altamente eficaz e confere imunidade protetora contra o vírus, porém a cobertura vacinal ainda é insatisfatória e não há tratamento específico para a doença. Sabe-se que a resposta imunológica gerada após a vacinação e após a infecção natural são semelhantes, mas faltam estudos que detalhem o desenvolvimento da imunidade após a infecção, principalmente nos casos que evoluem para gravidade e óbito. Um estudo prévio de nosso grupo utilizando uma coorte de indivíduos infectados pelo YFV ($n = 70$) identificou por citometria de fluxo que a frequência de células secretoras de anticorpos (ASC) circulantes ($CD20^+ CD27^{\text{high}} CD38^{\text{high}}$), particularmente plasmoblastos ($CD138^+$), foi significativamente maior em indivíduos que foram a óbito ($n = 26$; $p < 0,01$), com ápice no 6º dia após o início dos sintomas, com indivíduos chegando a 80% de ASC dentro da frequência total de células B, uma magnitude nunca antes descrita. O baço é um órgão linfóide secundário de grande importância, onde ocorre o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, funcional e protetora, e, investigar o seu papel durante a imunopatogênese da febre amarela, a fim de se caracterizar como a resposta é construída nesses indivíduos, é essencial. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar as modificações da imunidade tecidual do baço de indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV selvagem ($n=24$) e de indivíduos que realizaram esplenectomia pós-trauma ($n=10$), bem como informações clínicas e demográficas. Os fragmentos foram processados para microscopia ótica, tanto para avaliação histológica quanto para a técnica de imuno-histoquímica e mostraram um claro desarranjo da polpa branca do baço, com diminuição de subtipos celulares essenciais para a montagem da resposta, como macrófagos, linfócitos T e, linfócitos B e seus subtipos celulares, e aumento de subtipos celulares responsáveis pela formação de centros germinativos, migração celular e produção de imunoglobulinas. Em conjunto, nossos dados analisados de forma integrada fornecem novos aspectos sobre a imunopatogênese da febre amarela, sugerindo uma resposta imunológica desequilibrada e prematura em indivíduos que foram a óbito e representam os passos iniciais para a caracterização do desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa nos indivíduos infectados pelo vírus da febre amarela.

Palavras-chave: Febre amarela. Baço. Imuno-histoquímica. Células produtoras de anticorpos. Imunidade inata. Imunidade adaptativa.

ABSTRACT

Marmorato MP. Investigation of the spleen involvement in the yellow fever immunopathogenesis [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Pós-graduação em Alergia e Imunopatologia, 2023.

Yellow fever is an infectious disease that continues to represent a public health problem in Brazil. In 2018, 504 wild cases were confirmed, with a fatality rate of 35% during the outbreak that occurred in the state of São Paulo. The yellow fever virus (YFV) vaccine is highly effective and provides protective immunity against the virus, but vaccination coverage is still unsatisfactory and there is no specific treatment for the disease. It is known that the immune response generated after vaccination and after natural infection are similar, but there is a lack of studies detailing the development of immunity after infection, especially those evaluating severe and deceased YFV infection cases. A previous study by our group using a cohort of YFV-infected individuals (n = 70) identified by flow cytometry that the frequency of circulating antibody-secreting cells (ASC) (CD20⁻ CD27^{high} CD38^{high}), particularly plasmablasts (CD138⁺), was significantly higher in individuals who died (n = 26; p < 0.01), with a peak on the 6th day after the onset of symptoms, with some individuals showing magnitudes never described and reaching 80% of ASC within the total frequency of B cells. Knowing that the spleen is a secondary lymphoid organ of great importance, and it is where the development of the adaptive, functional, and protective immune response occurs, it is essential to investigate its role during the immunopathogenesis of yellow fever, to characterize how the response is constructed in YFV infected individuals. Therefore, the aim of this work was to analyse the changes in tissue immunity in the spleen obtained from individuals who died after YFV infection, describing the splenic histological changes, and characterizing in situ immunity. For this purpose, spleen specimens were collected from individuals who died after infection with YFV (n=24) and from individuals who underwent post-trauma splenectomy (n=10). The tissue fragments were processed for optical microscopy, both for histological evaluation and for the immunohistochemical analysis and showed a clear disarrangement of the white pulp of the spleen, with a decrease in cellular subtypes essential for mounting the response, such as macrophages, T lymphocytes and B lymphocytes and its cellular subtypes, and an increase in cellular subtypes responsible for the formation of germinal centres, cell migration and production of immunoglobulins when compared with the splenectomy group. Taken together, our data, analysed in an integrated manner, provide new aspects about the immunopathogenesis of yellow fever, suggesting an unbalanced and premature immune response in individuals who died of yellow fever and represent the initial steps towards characterizing the development of the adaptive immune response in individuals infected by YFV.

Keywords: Yellow fever. Spleen. Immunohistochemistry. Antibody-producing cells. Innate immunity. Adaptive immunity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Febre amarela

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 à família *Flaviviridae*, do gênero *orthoflavivirus* anteriormente denominado *flavivirus* (1).

1.1.1. O vírus e a patogênese

O vírus da febre amarela (YFV, do inglês, *Yellow Fever Virus*) apresenta apenas um sorotipo, com variações genéticas conhecidas e identificadas na América e África (1). O YFV possui um genoma de RNA de fita positiva com comprimento de aproximadamente 11 kb que codifica uma poliproteína composta por três proteínas estruturais [capsídeo (C), proteína precursora de membrana (prM) e envelope (E)] e sete proteínas não estruturais (NS, do inglês, *non-structural*) (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (2) (Figura 1).

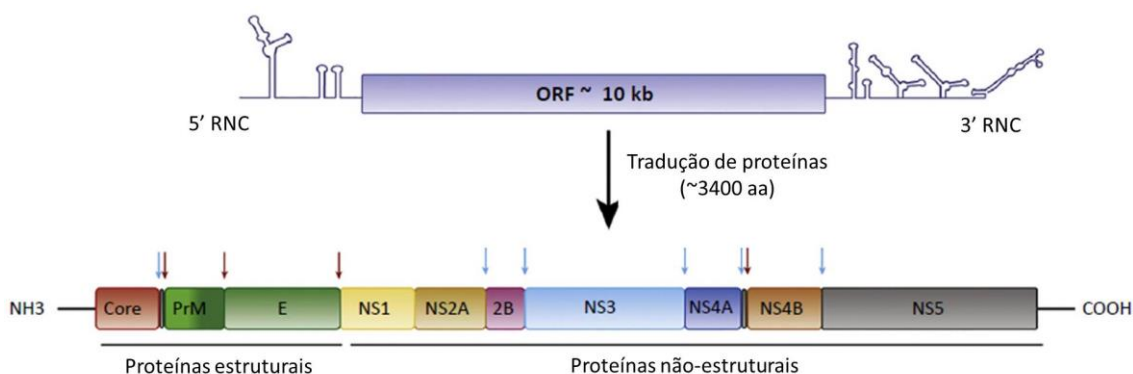


Figura 1. Representação da organização do genoma do YFV e da poliproteína codificada.

FONTE: Adaptado de Douam et al., 2018 (3).

NOTA: O esquema da poliproteína, as setas menores indicam os sítios de clivagem em que proteases de origem celular e viral agem durante o processamento pós-transcricional.

A transmissão do YFV ocorre por meio da picada de mosquitos da família *Culicidae*, sobretudo dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus*, responsáveis pelas formas urbana e silvestre da doença, causadas pelo mesmo vírus, porém possuindo distinções dentro do ciclo de transmissão, sendo que a forma silvestre geralmente envolve primatas não-humanos e humanos e tem o vetor *Haemagogus*, enquanto que a forma urbana envolve apenas humanos no ciclo de transmissão mediado pelo vetor *Aedes aegypti* (4). No Brasil, o vírus pode ser transmitido também através da picada do mosquito *Sabethes* sp., pertencente à família *Culicidae*, fazendo parte do ciclo da febre amarela silvestre

(4,5). Os humanos infectados pelo YFV não são os hospedeiros finais do vírus, sendo capazes de contaminar mosquitos durante o período de pico de viremia (6).

A patogênese da febre amarela inicia-se após a transmissão do YFV por um mosquito infectado. A replicação do vírus acontece nos linfonodos localizados mais próximos ao local de entrada e se dissemina para outros órgãos, especialmente o fígado (7–9). A viremia pode ser detectada a partir da disseminação do YFV para outros órgãos, o que ocorre poucas horas após a infecção e pode durar por aproximadamente 48 horas, em casos mais leves, até sete dias em casos mais graves (6,10), sendo significativamente maior e com maior duração em indivíduos que vão a óbito pela doença (11). As manifestações clínicas são diversas e os sintomas podem se apresentar de forma moderada em aproximadamente 80% dos casos, sendo os principais relatados: febre, mialgia, dor de cabeça, bradicardia, dor abdominal, náusea e vômito (6,12). A evolução da doença muitas vezes é caracterizada por febre hemorrágica acompanhada de acometimento hepático e renal progressivos (6,12).

1.1.2. Epidemiologia

A primeira epidemia documentada de febre amarela ocorreu no ano de 1648, no México (6,13,14). O vírus permanece endêmico nas regiões tropicais e subtropicais da América Latina e da África, onde ocorreram diversas epidemias até o presente momento (15–17). Associado às variações climáticas, o movimento das populações tem ampliado o risco de epidemias para áreas tipicamente não endêmicas, ocasionando diversos casos importados da doença (18).

Em 2017 ocorreu um surto de febre amarela na Nigéria, onde 341 casos suspeitos foram notificados, sendo a taxa de letalidade de 28,1% (19); já no ano de 2019 foram reportados, nesse mesmo país, 2.254 casos suspeitos da doença entre os meses de Janeiro e Agosto (20). Atualmente, 47 países da África, da América Central e do Sul têm regiões onde existe risco de febre amarela, sendo notificados aproximadamente 200.000 casos por ano em todo o mundo com a taxa de letalidade chegando a 30% (21).

No Brasil, os últimos casos de febre amarela urbana foram notificados em 1942 (22). Com relação à febre amarela silvestre, entre os anos de 2000 e 2010, foram confirmados 324 casos, dos quais cerca de 50% evoluíram para óbito (23). Posteriormente, em 2015, casos da febre amarela silvestre também foram observados no Mato Grosso do Sul, Goiás e Pará (24,25). Entre 2016 e 2017 novos surtos da doença silvestre foram confirmados na região sudeste do país e foi constatado que o YFV havia

voltado a circular nas regiões norte e nordeste do estado de São Paulo após a confirmação de 38 casos positivos para febre amarela em primatas não-humanos (26).

O monitoramento dos casos de febre amarela no Brasil realizado entre julho de 2017 e junho de 2018 notificou 7.518 casos suspeitos em todo o país, sendo 1.376 confirmados, dos quais 35% evoluíram para óbito (27). Além desses, foram confirmados 864 casos em primatas não humanos no mesmo período (27). Esse foi considerado o maior surto de febre amarela no Brasil desde 1980 (Figura 2), e, grande parte dos casos notificados foi proveniente da região sudeste do país, principalmente dos estados de São Paulo e Minas Gerais (27).

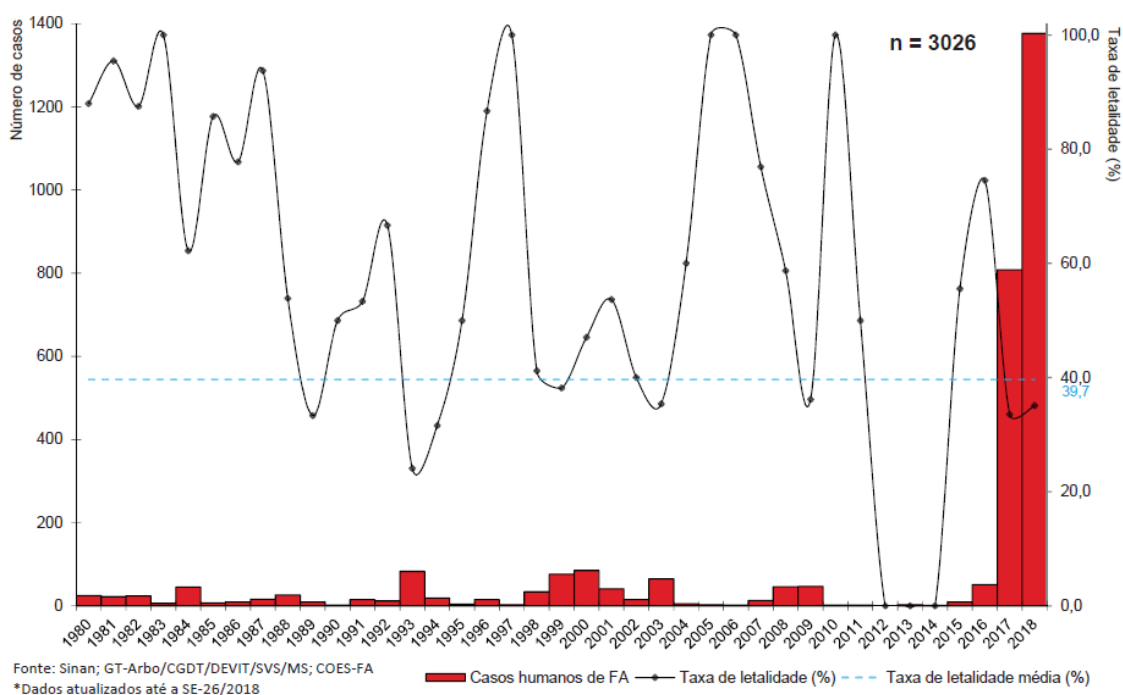


Figura 2. Casos confirmados para febre amarela e informação de letalidade entre os anos de 1980 e 2018, atualizado em outubro de 2018.

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

O estado de São Paulo foi o que mais notificou casos de febre amarela em 2018. Foram reportados 3.315 casos suspeitos da doença e 504 foram confirmados, com taxa de letalidade de 35% (28,29). Dos casos confirmados, 80,8% eram do sexo masculino e a mediana de idade foi de 43 anos (com intervalo de 5 até 90 anos). A maioria dos casos (n = 499) incluiu indivíduos residentes do estado, sendo as cidades com maior número de infecções: Mairiporã (152 casos), Atibaia (48 casos) e Nazaré Paulista (29 casos) (28).

A última atualização de 2019 sobre os casos de febre amarela no Brasil realizada, em junho, relatou 1.281 casos suspeitos, sendo apenas 82 casos confirmados, com taxa de letalidade de 17%. A maior parte desses casos foi proveniente dos estados de São Paulo e do Paraná (30). Em 2019 o estado de São Paulo contabilizou 789 casos suspeitos da doença, sendo 67 confirmados e 13 óbitos decorrentes da doença até novembro do mesmo ano (31).

1.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico da febre amarela pode ser complexo, especialmente durante a fase inicial da doença, quando os sintomas são facilmente confundidos com outras infecções como malária, leptospirose e algumas hepatites virais (principalmente hepatites B e D), bem como infecções causadas por outros orthoflavivirus, incluindo os vírus da dengue (DENV) e zika (ZIKV), devido aos sintomas e apresentação clínica muito semelhantes (32,33). A doença é diagnosticada com base em sintomas, exames laboratoriais e histórico de viagens para lugares endêmicos que podem indicar a exposição ao vírus (34), porém, a metodologia padrão de escolha para confirmação da infecção pelo YFV é a detecção do RNA viral pela PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*); além disso, existem outros métodos utilizados, como a detecção do antígeno viral por imunocoloração ou a detecção de IgM no soro a partir da técnica de ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (33,35), sendo esta última somente indicada a partir do quinto dia após início de sintomas e podendo apresentar reação cruzada com outras orthoflavivirose (12).

1.1.4. Tratamento

Atualmente não existe um tratamento específico para a febre amarela. Na prática clínica são aplicados cuidados para tratar os sintomas apresentados pelos indivíduos infectados, sendo recomendada a prevenção da hipoglicemia através da manutenção da nutrição, o tratamento com drogas vasoativas e a reposição de fluidos para o tratamento de hipotensão, como também o tratamento de infecções secundárias com antibióticos (12,33).

1.1.5. Vacina

Devido à dificuldade de diagnóstico e à falta de tratamento específico, a prevenção da febre amarela pela vacinação é a principal abordagem para evitar novos casos e manter o controle da doença.

A vacina contra febre amarela foi a primeira vacina de vírus vivo atenuado a ser utilizada em seres humanos (36), produzida pela primeira vez em 1937, a partir da cepa africana Asibi, a qual foi submetida a múltiplas passagens (quando um cultivo primário é subcultivado sequencialmente) 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, possuindo 195 passagens), 17D-213 (Rússia) e 17D-204 (China, França, Senegal e Estados Unidos) (6,16,37). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) as vacinas produzidas no Brasil, França, Rússia e Senegal podem ser distribuídas internacionalmente (16,38). As cepas 17DD e 17D-204 tem 99,9% de similaridade em suas sequências, diferindo em 20 aminoácidos para a cepa ancestral Asibi, sendo essa a diferença que impossibilita a transmissão desses vírus vacinais através de mosquitos (38,39).

As vacinas contra a febre amarela são extremamente eficazes e capazes de gerar imunidade protetora com apenas uma administração, conforme demonstrado em diversos estudos (14,40,41). Em vista disso, a OMS passou a recomendar a imunização com uma dose única da vacina para indivíduos que vivam em áreas endêmicas para o YFV ou que pretendem se deslocar até essas áreas, incluindo todas as crianças a partir de nove meses, essas com necessidade de reforço aos 4 anos de idade (6,38). As formulações vacinais são contraindicadas para pessoas com algum quadro de imunodeficiência, incluindo indivíduos vivendo com HIV que possuam contagem de CD4⁺ abaixo de 200/mm³, indivíduos com diagnóstico de câncer ou que estejam em uso de medicação imunossupressora, embora a vacinação desses grupos seja possível após avaliação médica (33).

No Brasil, a vacina contra a febre amarela 17DD está incluída no calendário nacional de vacinação e em sua última atualização o Ministério da Saúde expandiu a área de recomendação da vacina para todo território nacional (42). Atualmente, a recomendação da vacina no país é de uma dose padrão (0,5 ml) para crianças a partir de nove meses, estendendo-se para indivíduos até 59 anos de idade, com necessidade de reforço apenas para crianças que receberam uma dose da vacina antes dos 5 anos de idade (43).

1.1.6. Imunopatologia

Em razão das dificuldades do estudo da febre amarela selvagem em modelos animais e a escassez de coortes de indivíduos infectados, grande parte do aprendizado sobre a resposta imune induzida pelo YFV é originário de dados de estudos de coortes de indivíduos que receberam a vacina contra febre amarela, principalmente as formulações YFV-17D e YFV-17DD.

A resposta imune pós-vacinal envolve um processo de ativação e modulação da resposta imune inata e adquirida e a produção de diversas citocinas, caracterizando uma resposta complexa e polifuncional. Similar ao que ocorre nas infecções pelo DENV e outros orthoflavivirus (44–46), a cepa vacinal YFV-17D ativa monócitos e células dendríticas por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRR, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*), sendo os TLR (do inglês, *Toll Like Receptor*) 2, 3, 7, 8 e 9 os principais envolvidos (47,48). Essa ativação leva a indução da resposta imune inata logo nos primeiros dias após a vacinação.

O pico de viremia vacinal em humanos acontece aproximadamente no quinto dia após a imunização e tem duração média de dois dias (10). Já para a infecção natural o pico de viremia é identificado por volta do terceiro dia após o início de sintomas (49), cinética semelhante com a identificada em modelo de infecção com macacos *Rhesus* (50). Alguns relatos de casos sobre reações adversas com relação às vacinas 17D e 17DD descrevem um período de incubação do vírus de dois a cinco dias após a entrada da cepa vacinal (51,52), muito semelhante do estimado durante a infecção natural, na qual se considera um período de incubação de três a seis dias (53,54).

Sete dias após a vacinação é possível observar um aumento na frequência de monócitos com características pró-inflamatórias, e a ativação de neutrófilos, com aumento da produção de TNF- α (do inglês, *Tumor Necrosis Factor alpha*) (47) e da expressão de CXCR4 por essas células (55). Ainda com relação aos neutrófilos, foi observada uma frequência aumentada de neutrófilos CD23⁺ um mês após a vacinação com 17DD quando comparado com valores basais, marcador que possui importante papel na liberação de mediadores inflamatórios (55). Já as células NK apresentam um aumento de ativação uma semana após a imunização, porém não havendo um aumento na frequência dessas células na circulação, voltando a valores basais de ativação na segunda semana após o recebimento da vacina (56).

A resposta imune adaptativa é composta pela resposta de células T antígeno-específicas e pelo desenvolvimento de células B de memória duradoura e produtoras de

anticorpos. Ambas são críticas para geração da imunidade protetora de longo prazo, visto que as células T de memória específicas para o YFV e os anticorpos neutralizantes gerados pelas células B podem persistir por décadas na circulação de indivíduos vacinados (57–61).

Os linfócitos T $\gamma\delta$ são os primeiros a produzir IFN- γ (Interferon gama) a partir da primeira semana após a vacinação, seguidos pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, nesta ordem (47,62). A resposta celular direcionada após a vacinação tem como alvos as proteínas E, C e as proteínas não estruturais NS1, NS2A e B, NS3 e NS5, sendo as proteínas E, NS2 e NS3 os principais alvos para ambos os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (63,64).

Durante os primeiros 15 dias após a imunização com YFV-17D é possível observar uma intensa proliferação de linfócitos T CD8⁺ e a produção de citocinas antivirais como o próprio IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Interleucina 2) (65), assim como a produção de IL-10, IL-13 e IL-5 pelos linfócitos T CD4⁺ (63,66). A produção de IFN- γ auxilia na polarização da resposta pró-inflamatória do tipo Th1 (47) e a produção de IL-4 na polarização da resposta anti-inflamatória Th2, porém, apesar da resposta à vacina ser, em sua maioria, do tipo Th1, existe um balanço com a ativação da resposta Th2 (63,67).

Além da polarização de respostas Th1/Th2, a importância da regulação, da homeostase e da tolerância imunológica através dos linfócitos T reguladores (Treg) já foi documentada. Estas células podem ser identificadas como uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺ que expressam Foxp3, responsável pela supressão de genes de diversas citocinas de células T efectoras, como a IL-2 (68). A cinética de ativação dessas células no sangue periférico utilizando os marcadores CD38 e Ki67 já foi caracterizada, e observou-se um aumento significativo de ativação no décimo dia após a vacinação, voltando a valores próximos do basal no décimo quinto dia. Apesar dessa ativação significativa, a frequência de células Treg se mantém estável após a imunização (69).

A resposta imune humoral se inicia a partir do momento em que as células B reconhecem antígenos de superfície, quando são então ativadas e se diferenciam em células efectoras que secretam anticorpos. Essa ativação pode ser dependente ou não de linfócitos T CD4⁺ (70), embora evidências mostrem que frequências altas de linfócitos T CD4⁺ logo após a vacinação tem correlação com um título mais alto de anticorpos na circulação (71). A resposta T dependente compreende em sua maioria antígenos proteicos, ao passo que antígenos T independentes são definidos como moléculas

poliméricas com determinantes antigênicos em repetição, como por exemplo polissacarídeos microbianos (72).

De forma resumida, a resposta gerada de forma T independente acontece predominantemente de forma extrafolicular nos órgãos linfoides secundários (73). Essa ativação de células B sem a interação com células T tem como uma de suas possíveis consequências a ausência de troca de isotipo de anticorpo, gerando assim, em sua maioria, anticorpos do tipo IgM, mas também sendo capaz de produzir alguns anticorpos do tipo IgG, ambos produzidos por plasmoblastos rapidamente ativados (72–74). Já a resposta T dependente acontece a partir da interação entre linfócitos B e linfócitos T CD4⁺ ativados induzidos por antígenos dentro de centros germinativos de órgãos linfoides secundários, desencadeando a diferenciação dos linfócitos B em plasmoblastos, e sua consequente expansão clonal, ou em plasmócitos, células terminalmente diferenciadas, com pouca capacidade proliferativa (75,76). Essa ativação contribui para o aumento da expressão da enzima AID (do inglês, *Activation Induced Cytidine Deaminase*), essencial no processo das hiper mutações somáticas (SHM, do inglês, *Somatic Hipermutations*), que podem modificar a afinidade de ligação dos anticorpos ao antígeno, deixando-os mais específicos. Ao mesmo tempo, as imunoglobulinas alteram suas funções efetoras trocando a região constante IgM por IgG, IgA ou IgE, processo catalisado por componentes da maquinaria de SHM, como a própria enzima AID (77).

Os plasmoblastos são majoritariamente gerados de forma T independente e extrafolicular, possuem características de linfócitos B ativados e são considerados células de vida curta, com tempo de vida entre 3 e 5 dias, e, quando param de se dividir, entram em apoptose ou se diferenciam em plasmócitos, processo que ainda não está bem caracterizado (78,79). Os plasmócitos têm como um de seus nichos finais a medula óssea, local onde produzem pequena quantidade de anticorpos específicos que garantem proteção imediata em caso de uma reinfecção, e também têm a capacidade de continuarem circulantes, sendo responsáveis por uma reação mais rápida e eficaz em caso de futuro contato com o patógeno (70,77).

A cinética da resposta de linfócitos B desencadeada pelas cepas vacinais YFV-17DD e 17D é caracterizada por uma diminuição na contagem absoluta de células CD19⁺ circulantes na primeira semana após vacinação, seguido de um aumento dessas células a partir da segunda semana (71,80), principalmente de linfócitos B expressando proteínas como o CD32 (80), um receptor de Fc que auxilia no controle da produção de

IgG (81). Nesse período também podem ser observadas algumas células B expressando CD23 (80), um receptor de Fc, que também auxilia no controle da produção de IgG, presente principalmente em linfócitos B de centros germinativos (82).

A partir da segunda semana após a vacinação, as células secretoras de anticorpos (ASC, do inglês, *Antibody Secreting Cells*), incluindo os plasmoblastos e os plasmócitos, passam a iniciar a produção de anticorpos neutralizantes do tipo IgG direcionados à cepa vacinal do YFV (71,83), que podem permanecer no sangue por até 4 décadas após a imunização (57,84,85), sendo encontrados em mais de 90% dos indivíduos vacinados (86). As imunoglobulinas neutralizantes do tipo IgM aparecem mais precocemente, logo durante a primeira semana pós-vacinação, atingindo ápice na segunda semana (60,87,88). Alguns achados apontam que o aumento na frequência de plasmoblastos circulantes no sangue e a produção de anticorpos neutralizantes YFV-específicos inicia entre 3 e 7 dias após a vacinação, atingindo o ápice em duas semanas (89,90).

1.1.7. O baço e a febre amarela

O baço é um importante órgão linfoide secundário, considerado o filtro de sangue do corpo humano, por sua capacidade de retirar eritrócitos velhos da circulação, reciclar o ferro contido no sangue e ser a primeira linha de defesa contra patógenos presentes na circulação sanguínea periférica (91). Ele é envolto por uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo, que invade a parte interna do órgão formando trabéculas que dão o suporte para os diversos vasos sanguíneos e conferem rigidez ao órgão (Figura 3A) (92,93). O afluxo de sangue ao baço é por meio da artéria esplênica que se ramifica diversas vezes em arteríolas centrais no interior do órgão, onde adquirem uma bainha periarteriolar de linfócitos (PALS, do inglês, *Periarteriolar Lymphoid Sheaths*), caracterizada como polpa branca (Figura 3A-B). É nessa bainha onde ocorre a proliferação de linfócitos B, formando os folículos, e onde são encontrados centros germinativos, que estão espalhados em sua extensão, são transitórios e variam em quantidade de acordo com o estado imune do indivíduo (92,93).

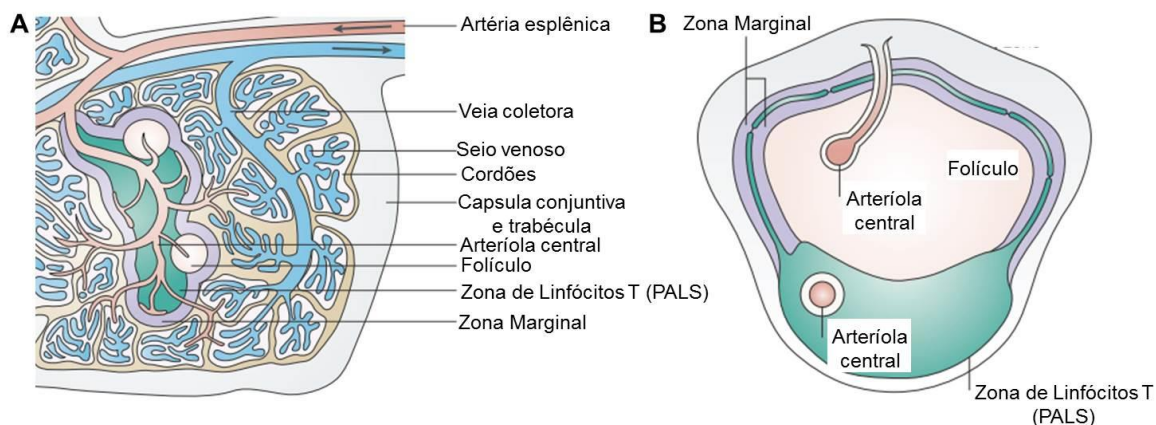


Figura 3. Representação esquemática da histologia de baço saudável.

FONTE: adaptado de Mebius et al., 2005 (92).

NOTA: Esquema representando a disposição histológica das estruturas do baço. **A.** Circulação sanguínea dentro do baço e algumas de suas principais estruturas. **B.** Em maior aumento: a região que contém a arteríola central e as estruturas adjacentes.

Durante a infecção, o antígeno presente na circulação sanguínea é direcionado para o interior do baço através da artéria esplênica, sendo capturado por macrófagos e células dendríticas, típicas células apresentadoras de antígeno, e chega até a região de PALS, onde desencadeia a ativação de linfócitos T, que se direcionam até os linfócitos B, com os quais interagem para promover sua ativação e migração para os folículos linfoides. Os linfócitos B ativados presentes no folículo linfoide formam o centro germinativo, local onde ocorre a diferenciação dessas células, troca de isotipo de anticorpo e aumento de afinidade de ligação dos anticorpos ao antígeno apresentado por meio de SHM (92,94).

A localização dos linfócitos dentro do baço é condicionada pela interação entre diversos receptores e ligantes, por exemplo, as quimiocinas. Os linfócitos B que expressam o receptor CXCR5 necessitam da quimiocina ligante CXCL13, produzida por células dendríticas foliculares e células estromais adjacentes, para que ocorra a migração até a borda dos folículos. Da mesma forma, os linfócitos T e células dendríticas necessitam da presença das quimiocinas CCL9 e CCL21, essas produzidas principalmente por células estromais, para que ocorra a migração para a zona de células T, adjacente ao folículo (92,95).

Uma região muito importante do baço para o desenvolvimento das respostas imune inata e adaptativa é a zona marginal, uma zona transitória de entrada e saída de células da polpa branca e de movimentação das células para dentro ou fora do baço.

Essa migração de células também é direcionada através de uma rede de receptores e ligantes (92,95,96). Assim, pode-se dizer que a zona marginal tem grande importância na elaboração da resposta imune devido ao fato dessa região estar intimamente relacionada com o desenvolvimento da imunidade adaptativa, possuindo função de ponte entre as respostas imunes inata e adaptativa.

A zona marginal abriga parte importante da resposta primária T independente, garantindo assim uma resposta rápida e potente, porém não tão específica, visto a baixa taxa de SHM desencadeada pela ativação destas células por representantes da resposta imune inata (75,97). Os linfócitos B de zona marginal são um dos principais precursores de plasmoblastos, que também podem se diferenciar em plasmócitos, apesar da via de diferenciação mais aceita para estes últimos seja através de células B foliculares após uma reação T dependente em centros germinativos (75,76).

Os macrófagos da zona marginal expressam a lectina do tipo SIGNR1, a qual está relacionada com a captura de vírus presentes no sangue, representando uma etapa crucial da eliminação viral (98,99). E assim como os linfócitos B de zona marginal, as células dendríticas também podem migrar para a polpa branca por meio da expressão de CCR7 e têm uma correlação positiva com a proteção do indivíduo contra o patógeno durante o desenvolvimento da resposta imune (100).

A migração de células dendríticas para a polpa branca fornece a conexão necessária para o início da resposta imune adaptativa, pois a interação com os linfócitos T promove a sua ativação, a qual é essencial para a diferenciação dos linfócitos B em ASC e a produção de anticorpos de alta afinidade, em uma resposta T dependente (100). A interação entre linfócitos T ativados e os linfócitos B do folículo acontece pelo aumento da expressão de CXCR5 e diminuição de CCR7 pelos linfócitos T, o que promove a sua migração para a borda dos folículos onde se encontram os linfócitos B, os quais, por sua vez, apresentam um aumento da expressão de CCR7 para também migrar até a borda do folículo (92,95,100). Essa interação promove a diferenciação dos linfócitos B em plasmoblastos e plasmócitos, os quais podem permanecer nos centros germinativos da polpa branca ou migrar para a zona marginal, chegando na polpa vermelha e seguir para a circulação (78,101).

A presença de plasmoblastos e plasmócitos na polpa vermelha é conhecida, porém a razão e mecanismos envolvidos na retenção dessas células nesse local ainda é desconhecida. A migração dessas células para a polpa vermelha está associada ao aumento de expressão de CXCR4, receptor que tem como ligante a quimiocina

CXCL12, altamente expressa na polpa vermelha (74,102) e, em conjunto, CXCR4 e CXCL12 são essenciais para a manutenção de ASC e sua futura migração para um de seus nichos principais, a medula óssea (79). Para que essas células permaneçam vivas nessa região e possam sair para circulação, também foi observada a importância da presença de células dendríticas expressando CD11c, que também tem papel relevante durante a diferenciação das células B em plasmócitos (103). Por fim, apesar da diferenciação de plasmoblastos em plasmócitos não ter uma via definida, já foi demonstrado que o marcador clássico CD138, também conhecido como sindecano-1, expresso majoritariamente por plasmócitos, tem relação direta com sua sobrevivência e é uma marca de sua diferenciação partindo de plasmoblastos, quando acontece o início do aumento de sua expressão (79,104,105).

O conhecimento restrito sobre os processos que ocorrem no baço durante a infecção pelo YFV abre espaço para muitos questionamentos. É sabido que esse tecido sofre grandes alterações durante a infecção, como por exemplo a distensão dos folículos, principalmente por ser um tecido altamente relacionado com a maturação e ativação da resposta imune. Essas alterações, porém, parecem não afetar o tamanho e as definições macroscópicas do órgão (106,107). Relatos da literatura descreveram, em macacos *Rhesus* infectados pelo YFV, o acúmulo de grandes células mononucleares nos centros germinativos e a necrose dos mesmos (108) e as alterações encontradas em fragmentos de baço *post-mortem* de pessoas infectadas pelo YFV são também comumente observadas em casos de sepse bacteriana (107). A polpa branca destes indivíduos que foram a óbito pela doença, entre o terceiro e o décimo dia após início de sintomas, mostrou-se maior do que o normal (107). Esse aumento da polpa branca, causado em parte pela elevação do número e do tamanho de células endoteliais na região do centro germinativo, também foi associado à presença aumentada de células mononucleares que não são comumente detectadas no folículo, mas que, nesse caso, preenchem quase todo o espaço (106,107). Os relatos sobre o aumento da polpa branca após infecção pelo YFV coincidem com uma perda significativa de linfócitos circulantes, que aparentam não estar localizados em outras regiões do baço, sugerindo que essa leucopenia poderia estar envolvida com a patogênese do vírus (106,107). Outro achado relevante foi o grande número de macrófagos presentes na polpa vermelha, em sua maioria contendo elementos fagocitados em seu interior (107,109). De acordo com o estudo de Bae e colaboradores (2005), o baço não aparenta apresentar partículas virais quando utilizado imunomarcção, porém o órgão apresenta grande quantidade de RNA

viral, o que não é observado em outros órgãos, como por exemplo a medula óssea, após óbito decorrente da infecção pelo YFV (110).

Uma importante descoberta sobre a patogenia da doença no baço foi a redução de células expressando CD20⁺ nos centros germinativos de macacas *Rhesus* infectadas pelo YFV que foram a óbito quando comparados com os animais sobreviventes. Além da diminuição de linfócitos B nessa região, foi identificada a presença de corpos apoptóticos, caracterizando a necrose do tecido. A histologia geral do tecido esplênico após a infecção também evidenciou hemorragia, sugerindo a congestão tecidual (111). Mais recentemente, após o acontecimento da epidemia de febre amarela na região metropolitana de São Paulo entre 2017 e 2019, um estudo comparando a autópsia convencional com autópsia minimamente invasiva desses casos demonstrou que o baço de indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV apresentava hipoplasia linfoide, citofagocitose e esplenite (112,113), corroborando com achados prévios da literatura e citados aqui anteriormente.

Em vista do pouco conhecimento publicado com relação ao papel do baço durante a patogenia da febre amarela em humanos, o estudo desse órgão é essencial e pode elucidar questões importantes acerca do desenvolvimento da resposta imunológica durante a infecção pelo YFV.

1.2. Justificativa

Dados ainda não publicados do nosso grupo caracterizaram a cinética de expansão de ASC circulantes no sangue periférico em uma coorte de 70 indivíduos infectados naturalmente pelo YFV selvagem (FAPESP 2017/08953-8). Nossos achados foram obtidos após análise por citometria de fluxo multiparamétrica em sangue total fresco, utilizando os marcadores CD3, CD14, CD19, CD20, CD27, CD38 e CD138, além do marcador de viabilidade celular LIVE/DEAD[®] Fixable Red Dead Cell Stain Kit (Life Technologies). A população de ASC foi definida como CD3⁻ CD14⁻ CD19⁺ CD20⁻ CD27^{high} CD38^{high} (114) (Figura 4) e dentro desta foram identificadas as subpopulações de plasmoblastos e plasmócitos utilizando o marcador CD138 para a distinção, sendo a população de plasmoblastos definida como ASC CD138⁻ e plasmócitos como ASC CD138⁺ (76,79,105) (Figuras 5 e 6).

As amostras de sangue periférico foram coletadas nos dias 4, 6, 10, 12, 14 e 30 após o início de sintomas, conforme relatado pelos próprios pacientes durante a admissão. A mediana de idade foi de 42 anos (mínima de 19 e máxima de 73 anos),

sendo 88,6% do sexo masculino. Dentro desta coorte ocorreram 26 óbitos, sendo a taxa de letalidade de 37,1% e, desses óbitos, 24 tiveram autópsia realizada no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC-SP), localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com coleta e armazenamento de fragmentos de baço que foram utilizados neste trabalho (representados pelos pontos vermelhos, Figuras 4-6).

Para a análise de ASC circulantes após citometria de fluxo, os indivíduos infectados foram separados em dois grupos de acordo com o desfecho clínico, sobrevivência e óbito. Durante a infecção natural, um aumento significativo na frequência de ASC totais circulantes foi identificado em ambos os grupos de pacientes a partir do 4º dia após início dos sintomas em comparação com as amostras de indivíduos não infectados pelo YFV (grupo CTR, controle) (Figura 4). O ápice da expansão de ASC, bem como da população de plasmoblastos circulantes, foi detectado no 6º dia após início de sintomas para os dois desfechos, sendo significativamente maior em ambos os grupos de infectados (sobreviventes e óbitos) quando comparado ao grupo CTR (Figuras 4-5). No grupo de indivíduos sobreviventes, essa frequência detectada no 6º dia também foi significativamente maior quando comparada ao 30º dia após início de sintomas desse mesmo grupo, na fase de convalescência desses indivíduos (Figuras 4-5). Ainda com relação às frequências detectadas no 6º dia após início de sintomas, o grupo com desfecho de óbito (medianas de frequência de 55,7% para ASC totais e 44,8% para plasmoblastos) atingiu valores significativamente maiores comparados àqueles observados no grupo sobrevivente (mediana de 23,3% para ASC e 16,4% para plasmoblastos). Nos dois grupos, a frequência aumentada de ASC e plasmoblastos (ASC CD138⁺) circulantes foi observada até o 14º dia após início de sintomas, momento em que essas frequências ainda apresentaram diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo CTR (Figuras 4-5).

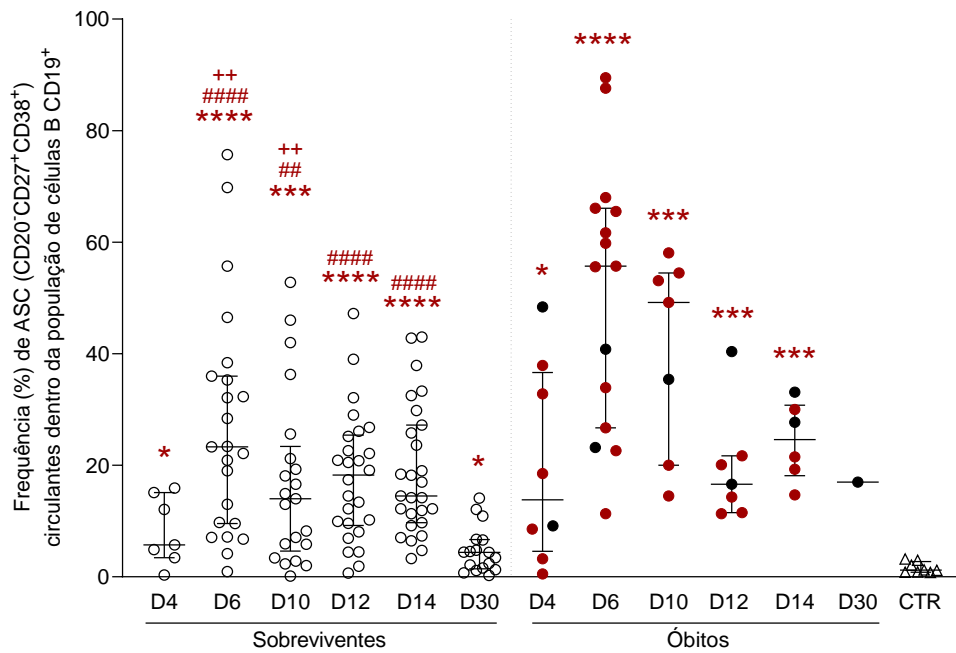


Figura 4. Cinética de expansão de ASC circulantes nos indivíduos com infecção natural pelo YFV (n=70).

NOTA: Os grupos foram separados baseando-se no desfecho clínico, sendo eles: Sobreviventes (alta hospitalar, n = 44) e Óbitos (n = 26). *p <0,05, ***p <0,001, ****p <0,0001 vs. CTR; ##p <0,01, ####p <0,0001 vs. D30 sobrevivente; e ++p <0,01 vs. D correspondente do grupo óbito. ASC, células secretoras de anticorpos (ASC, do inglês, *Antibody Secreting Cells*). D, dias após início de sintomas. CTR, grupo controle de indivíduos não infectados pelo YFV em um único momento no tempo. Pontos vermelhos representados no grupo óbito são referentes aos indivíduos incluídos na coorte de fragmentos de baço.

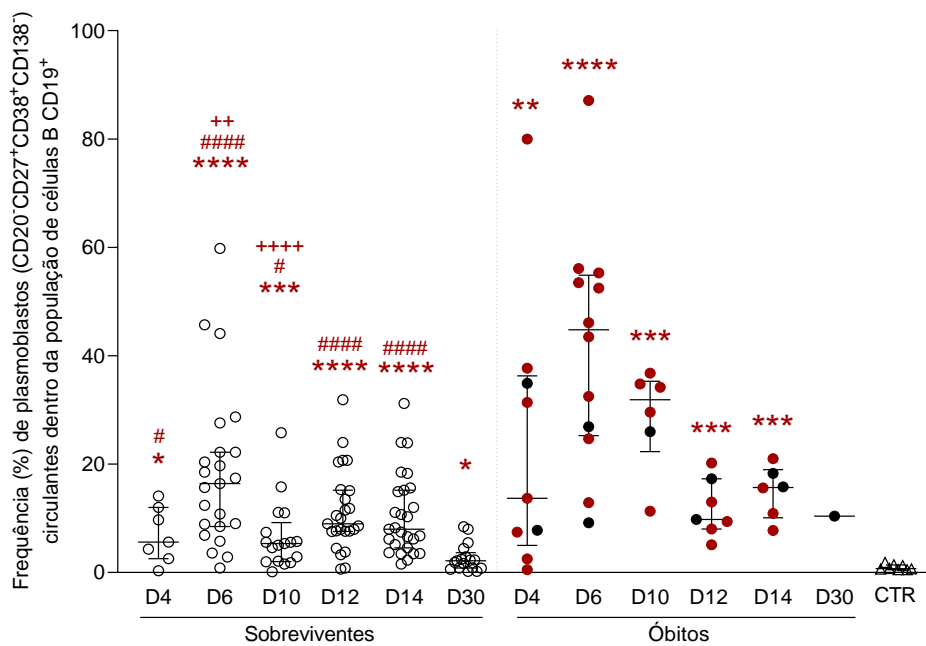


Figura 5. Cinética de expansão de plasmoblastos circulantes nos indivíduos com infecção natural pelo YFV (n=70).

NOTA: Os grupos foram separados baseando-se no desfecho clínico, sendo eles: Sobreviventes (alta hospitalar, n = 44) e Óbitos (n = 26). *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001 vs. CTR; #p <0,05, ####p <0,0001 vs. D30 sobrevivente; e ++p <0,01, +++p <0,0001 vs. D correspondente do grupo óbito. ASC, células secretoras de anticorpos (ASC, do inglês, *Antibody Secreting Cells*). D, dias após início de sintomas. CTR, grupo controle de indivíduos não infectados pelo YFV em um único momento no tempo. Pontos vermelhos representados no grupo óbito são referentes aos indivíduos incluídos na coorte de fragmentos de baço.

Com relação à população de plasmócitos, definida como CD138⁺, não foi identificada uma cinética de expansão clara para ambos os desfechos quando comparado ao 30º dia desses mesmos voluntários e ao grupo CTR. Apesar de não ser possível observar um ápice claro da frequência dessas células nos indivíduos com desfecho de sobrevivência, o grupo com desfecho óbito apresentou um pico de frequência no décimo dia após início de sintomas (mediana de 16,1% em contrapartida à mediana de 4,0% do grupo sobrevivente), único ponto no qual existiu diferença entre os dois desfechos para este subtipo de linfócitos B (Figura 6).

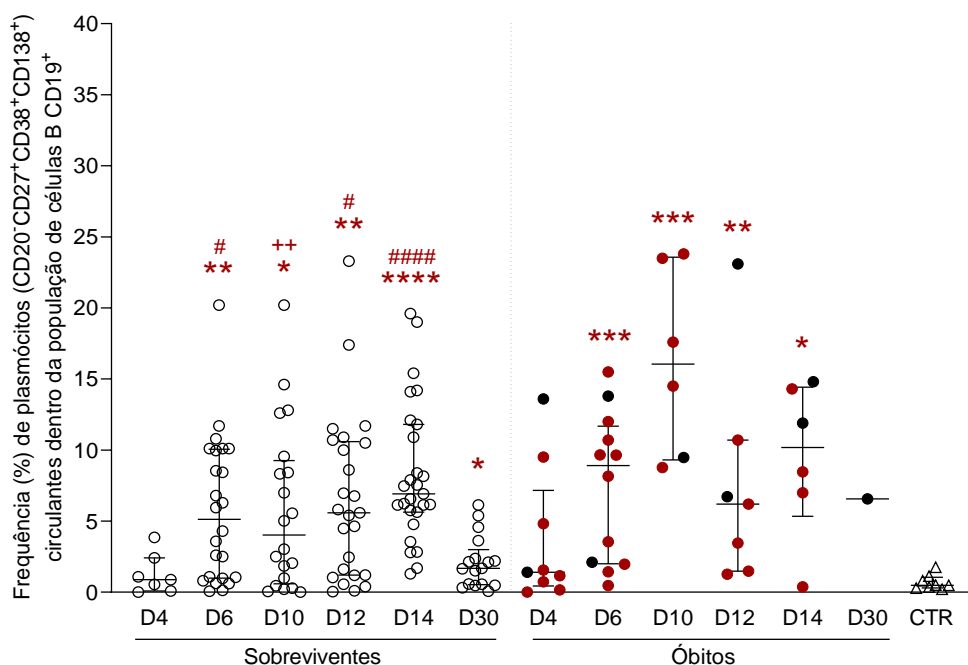


Figura 6. Cinética de expansão de plasmócitos circulantes nos indivíduos com infecção natural pelo YFV (n=70).

NOTA: Os grupos foram separados baseando-se no desfecho clínico, sendo eles: Sobreviventes (alta hospitalar, n = 44) e Óbitos (n = 26). *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001 vs. CTR; #p <0,05,

###p <0,0001 vs. D30 sobrevivente; e ++p <0,01 vs. D correspondente do grupo óbito. ASC, células secretoras de anticorpos (ASC, do inglês, *Antibody Secreting Cells*). D, dias após início de sintomas. CTR, grupo controle de indivíduos não infectados pelo YFV em um único momento no tempo. Pontos vermelhos representados no grupo óbito são referentes aos indivíduos incluídos na coorte de fragmentos de baço.

A magnitude de expansão evidenciada em nosso trabalho anterior é inédita e, para nosso conhecimento, não foi observada em outras orthoflavivirose. Apesar de apresentar uma dinâmica de expansão semelhante à observada em infecções como dengue (115,116) e zika (117), não foi relatada magnitude similar de expansão como a observada em nossa coorte, na qual alguns casos atingiram frequência de ASC superior a 80% dentro da população total de células B.

Dentro desta mesma coorte, análises histopatológicas de fragmentos do baço dos indivíduos que foram a óbito, autopsiados pelo SVOC-SP, evidenciaram alterações na estrutura e organização histológica esplênica desses indivíduos (112). Diante destes achados histopatológicos no baço e da alta frequência de ASC circulantes observadas no sangue periférico, verificou-se a necessidade de elucidar o papel do baço na patogenia da infecção pelo YFV, sua relação com a expansão de ASC circulantes e com o desenvolvimento da imunidade durante a infecção natural, como também sua associação com o prognóstico da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Analisar as modificações da imunidade tecidual do baço em indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV.

2.2. Objetivos Específicos

- Descrever as alterações histológicas esplênicas de indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV comparando-as com indivíduos sem quadro infeccioso agudo;
- Caracterizar o *status* da imunidade *in situ* em fragmentos de baço de indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV comparando-as com indivíduos sem quadro infeccioso agudo;
- Integrar os dados da resposta de ASC em sangue periférico (obtidos em nosso trabalho anterior) com os dados histopatológicos de tecido esplênico obtidos neste trabalho, a fim de verificar a existência de uma associação entre o perfil imunopatogênico no baço e a resposta imune periférica nos indivíduos naturalmente infectados com YFV e sua relação com o desfecho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

Este projeto está contido dentro de um estudo prévio que envolveu indivíduos naturalmente infectados pelo YFV que foram a óbito e indivíduos não infectados que passaram por esplenectomia pós-trauma intitulado “Estudo descritivo dos achados epidemiológicos, clínicos, anatomopatológicos e microbiológicos dos casos autopsiados com suspeita de febre amarela pelo departamento de anatomia patológica, durante a epidemia de febre amarela no Estado de São Paulo em 2017-2018” (CAAE 41772720.5.0000.0068 e Parecer: 4.590.740) (ANEXO A).

3.2. Casuística

Para o presente estudo, foram utilizados fragmentos de baço de indivíduos naturalmente infectados com o YFV que foram a óbito (n = 24) e de indivíduos não infectados que passaram por esplenectomia pós-trauma (n = 10).

3.2.1. Casos de Febre Amarela

Este grupo é composto por indivíduos com diagnóstico confirmado de febre amarela admitidos no Hospital das Clínicas da FMUSP (HC-FMUSP) ou no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), que foram a óbito e cujos fragmentos de baço puderam ser obtidos durante autópsia no SVOC-SP.

A febre amarela foi definida por quadro clínico compatível e confirmada pela detecção do RNA viral em plasma por PCR e/ou exames sorológicos (detecção de IgM específica para o YFV) e imuno-histoquímica de tecido *post mortem* para verificar a presença do vírus.

3.2.2. Controles

Para o grupo controle foram selecionados baços de indivíduos sem quadro infeccioso agudo em atendimento no HC-FMUSP, submetidos à esplenectomia por laparotomia exploratória devido a trauma abdominal.

3.3. Dados demográficos e laboratoriais

Dados como idade, sexo, intervalo de tempo entre início de sintomas e óbito, intervalo de tempo entre o óbito e a realização da autópsia, bem como resultados de exames complementares sanguíneos realizados durante a rotina do hospital – creatinina,

bilirrubina total, aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e contagem de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas – foram coletados de todos os indivíduos pertencentes do grupo febre amarela.

3.4. Autópsia e coleta de amostras, fixação, processamento e inclusão em parafina para análise sob microscopia de luz

As autópsias foram realizadas no Departamento de Patologia da FMUSP (DAP-HCFMUSP) após autorização por escrito dos familiares de primeiro grau. Do óbito até a autópsia, o tempo variou de 4h20min a 13h14min. A técnica de autópsia utilizada foi a de Letulle, onde todos os órgãos são examinados. Os baços foram examinados externamente, pesados, e amostras de 5,0 x 5,0 x 2,0 cm foram coletadas e imediatamente fixadas em formalina tamponada a 10%. Após fixação por 48 horas, os fragmentos de baço coletados foram desidratados em uma série crescente de etanol (70%, 95% e 100%) e incluídos em parafina. Cortes de 4 µm foram obtidos com micrótomo e depositados em lâminas de vidro, desparafinizados em um banho de xilol durante 30 minutos a 56°C (em estufa) e mais dois banhos de xilol à temperatura ambiente durante 5 minutos, sendo posteriormente hidratados em sequência decrescente de etanol (dois banhos de etanol absoluto durante 2 minutos cada, e três banhos de etanol 95% durante 1 minuto cada) e finalmente corados com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histológica.

A avaliação foi realizada utilizando o microscópio ZEISS, AXIOSKOP 2, do Laboratório de Investigação Médica 06 (Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose e Outras Parasitoses), Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, o qual possibilitou a obtenção de fotos. As áreas do tecido foram obtidas com o auxílio do software ZEN 3.1 (blue edition) (ZEISS).

3.5. Método imuno-histoquímico

Para realização das reações de imuno-histoquímica, cortes histológicos de 4 µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3-amino-propil-tri-etoxi-silano (Sigma-Aldrich). Após feita a desparafinização, foi realizado o bloqueio de pigmentos de formol com imersão dos cortes em solução de hidróxido de amônio 25% diluído em álcool 95% por 15 minutos à temperatura ambiente; em seguida, os cortes foram lavados em água (quatro banhos de 3 minutos cada).

A exposição antigênica foi realizada utilizando vaporizador a 96°C ou banho-maria a 95°C durante 20 a 30 minutos em solução tampão de citrato de sódio, tampão EDTA pH 9 (TRIS-EDTA 10/1mM, Dako) ou ácido cítrico pH 6, variando de acordo com os diferentes anticorpos, deixando-se esfriar por 20 minutos antes de realizar quatro lavagens em água durante 3 minutos cada.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com duas incubações em água oxigenada (20 volumes) 3% por 10 minutos; em seguida, os preparados foram novamente lavados três vezes em água por 3 minutos cada e uma vez com água destilada também por 3 minutos, sendo colocados posteriormente em tampão PBS pH 7,4 para estabilização.

Para o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido os cortes foram incubados em solução bloqueadora (Kit Reveal System, Spring) ou Avidina-Biotina (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos, após delimitação dos cortes com caneta hidrofóbica (Liquid Blocker, EasyPath). Em seguida os cortes foram lavados com PBS pH 7,4 durante 5 minutos e, incubados com os anticorpos primários (Tabela 1 e 2), que foram diluídos em solução de PBS (0,01 M pH 7,4) contendo 1% de BSA na proporção obtida após a padronização, por 18h a 4°C.

Após três lavagens com tampão PBS pH 7,4 por 5 minutos cada, foi feita a incubação com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho ou de camundongo produzido em cabra (Kit Reveal System, Spring) durante 30 minutos. Os preparados foram novamente lavados 3 vezes em tampão PBS pH 7,4 durante 5 minutos. As reações foram reveladas com solução cromógena de diaminobenzidina (60g de 3,3'-diaminobenzidina diluído em 100 ml de PBS pH 7,4, filtrado, acrescido de 1 ml de água oxigenada 20 volumes e 1 ml de Tween) durante 5 minutos. A intensidade de cor foi controlada no microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam cada reação. Controles negativos também foram utilizados em cada reação, omitindo-se o anticorpo primário.

Os preparados assim processados foram lavados em água por 10 minutos, contra corados com Hematoxilina de Carazzi por 2 minutos, lavados em água destilada (quatro lavagens de 3 minutos cada), desidratados em etanol (três lavagens de 2 minutos em etanol 95% e três lavagens de 2 minutos em etanol absoluto) e diafanizados em xilol (duas lavagens de 2 minutos cada). A montagem das lâminas foi feita com Entellan (Sigma-Aldrich).

Tabela 1. Relação de anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica e suas diluições correspondentes.

Anticorpo	Marca/Catálogo	Diluição
Ig de coelho anti-Bcl6	Cell Marque/227R-24	1:200
Ig de coelho anti-CD3	Cell Marque/103R-94	1:1000 - 1:5000
Ig de camundongo anti-CD10	Cell Marque/110M-15	1:100
Ig de camundongo anti-CD20	Cell Marque/120M-84	1:1500
Ig de coelho anti-CD23	Cell Marque/123R-24	1:1500
Ig de coelho anti-CD39	Thermo/JA90-36	1:100
Ig de coelho anti-CD45	Abcam/ab40763	1:4000 - 1:6000
Ig de camundongo anti-CD68	Dako/GA60961-2	1:5000
Ig de coelho anti-CD138	Cell Marque/138R-14	1:100
Ig de coelho anti-CXCR4	Abcam/ab124824	1:1800
Ig de coelho anti-CXCR5	Abcam/ab203212	1:1500
Ig de coelho anti-Foxp3	Cell Marque/EP340	1:100
Ig de coelho anti-IgG	Dako/A090	1:30000
Ig de camundongo anti-IFN γ	Novus Biologicals/NBP2-53332	1:5000
Ig de cabra anti-IL10	R&D Systems/AF-217-NA	1:200
Ig de cabra anti-IL12	Abcam/ab9992	1:50
Ig de coelho anti-IL33	Abcam/ab207737	1:3000
Ig de camundongo anti-NK1	Thermo/MA1-70100	1:1000
Ig de coelho anti-rIFN γ	Abcam/ab175878	1:500
Ig policlonal de cabra anti-YFV	Instituto Pasteur Dakar	1:20000

Tabela 2. Descrição dos marcadores utilizados como anticorpos primários para a técnica de imunohistoquímica.

Marcador	Descrição
Bcl6	Expresso por células B e T CD4 ⁺ de centros germinativos (118)
CD3	Marcador geral de células T
CD10	Expresso por células B reativas de centros germinativos (119)
CD20	Marcador geral de células B
CD23	Expresso por células B foliculares maduras (120)
CD39	Enzima que converte ADP em ATP, caracterizando a ativação na

	maioria dos leucócitos (121)
CD45	Marcador geral de leucócitos
CD68	Marcador geral de macrófagos
CD138	Expresso por ASC, majoritariamente em plasmócitos (79)
CXCR4	Migração de células dentro do baço e para a circulação (102)
CXCR5	Expresso por linfócitos B nos folículos da polpa branca (92)
Foxp3	Células T reguladoras, subpopulação de células T CD4 ⁺ (68)
IgG	Anticorpo do isotipo IgG de superfície ou secretada
IFN γ	Citocina produzida por células T e NK, a qual promove a ativação de macrófagos e coordena o balanço entre Th1 e Th2 (122)
IL10	Citocina majoritariamente produzida por células T, monócitos, macrófagos e células dendríticas, possuindo caráter anti-inflamatório e perfil Th2 (123)
IL12	Citocina produzida por células dendríticas e macrófagos, possuindo caráter pró-inflamatório e perfil Th1 (124)
IL33	Citocina de alarme para dano tecidual, predominantemente produzida por células epiteliais (125)
NK1	Marcador de células NK
rIFN γ	Receptor da citocina IFN γ , expresso pela maioria das células, baço principalmente expresso na polpa vermelha (126)
anti-YFV	Marcador para detecção do antígeno de YFV

3.6. Análise histológica e imuno-histoquímica

3.6.1. Análise quantitativa

Os cortes imunomarcados foram analisados com auxílio do microscópio ZEISS, AXIOSCOP 2 e software ZEN 3.1 (blue edition) (ZEISS).

Utilizando a objetiva de 40x foram realizadas 10 fotos de campos distintos e sequenciais da região da polpa branca do baço, adjacente à arteríola central, de cada lâmina, sendo uma lâmina por indivíduo (n = 24 para o grupo febre amarela e, n = 10 para o grupo controle) para cada um dos 19 marcadores avaliados e coloração de hematoxilina-eosina, totalizando 6800 fotos. A área foi mensurada, respeitando-se as dimensões da polpa branca adjacente à arteríola central (Figura 7) e os marcadores foram contabilizados manualmente, sendo o critério utilizado de presença de marcação, contabilizado com valor igual a um (Figura 7). Os resultados foram expressos em

número de células por mm^2 , para isso os valores de área em μm^2 e da contagem de marcadores por foto foram inseridas em uma planilha, a área em μm^2 foi dividida por 10^6 para conversão em mm^2 , as contagens de cada marcador e as áreas foram somadas e divididas uma pela outra (Figura 8). Para a presença de antígenos dos YFV, foi considerada a expressão positiva, quando observado o cromógeno no citoplasma de células imune do baço, utilizando como controle positivo a marcação de hepatócito e células de Kupffer no fígado de pacientes com febre amarela.

A análise foi realizada com o auxílio do Dr. Amaro Nunes Duarte Neto, especialista patologista do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e colaborador de nosso projeto.

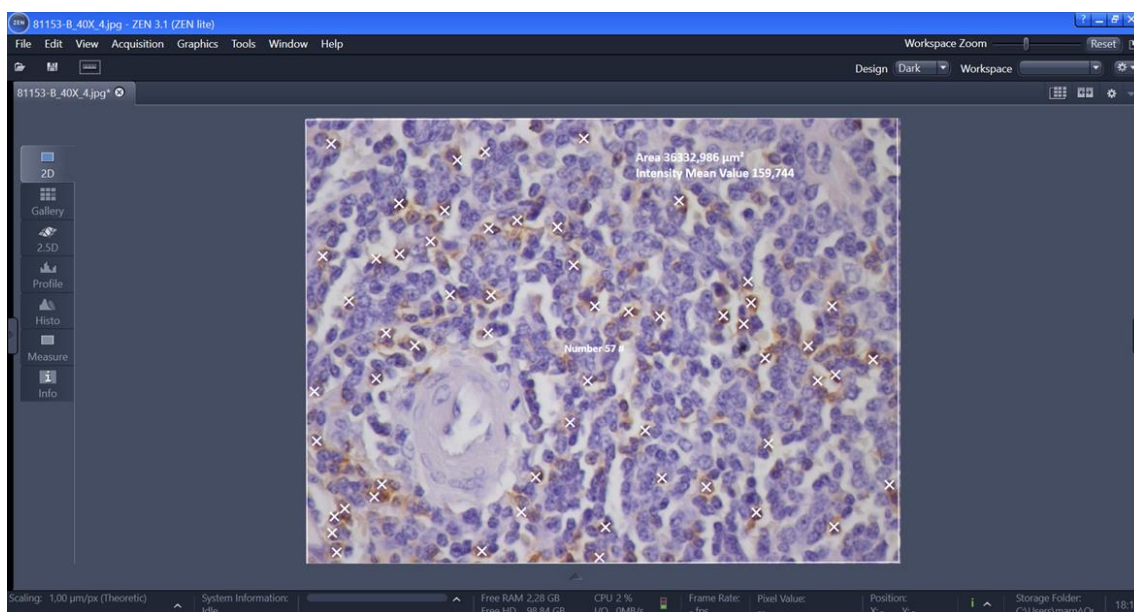


Figura 7. Exemplo de determinação de área (μm^2) e contagem de marcador.

NOTA: Software ZEN 3.1 (blue edition). Neste exemplo foram utilizadas as ferramentas “Rectangle (aligned)” para determinação da área ($36332,986 \mu\text{m}^2$) e “Events” para contagem do marcador (57 células marcadas), neste caso CD3.

CD3									
ID	Grupo	Campo	Nro de Célis	Área μm^2	Área mm^2	Total Célis	Total Área (mm^2)	Célis/Área	
386429	Controle	1	439	36312,25	0,036312	2791	0,35134125	7943,844	
		2	367	36294,63	0,036295				
		3	373	36329,77	0,03633				
		4	188	36041,02	0,036041				
		5	277	35971,44	0,035971				
		6	95	26916,3	0,026916				
		7	226	34758,52	0,034759				
		8	251	36329,34	0,036329				
		9	348	36329,77	0,03633				
		10	227	36058,21	0,036058				
B06-81	Controle	1	115	31311,21	0,031311	1343	0,27288709	4921,449	
		2	126	28022,35	0,028022				
		3	207	33215,18	0,033215				
		4	116	20726,99	0,020727				
		5	205	36119,8	0,03612				
		6	129	29407,07	0,029407				
		7	168	31631,21	0,031631				
		8	86	21758,93	0,021759				
		9	104	24884,98	0,024885				
		10	87	15809,37	0,015809				

Figura 8. Captura de tela representativa de planilha para cálculo de células por área (em mm^2).

NOTA: Captura de tela de planilha elaborada no Microsoft Excel onde são inseridas as contagens de células marcadas (“Nro de Célis”) e área (“Área μm^2 ”) por foto. A área em μm^2 é convertida em mm^2 e a quantidade de células contabilizadas e áreas são somadas para que o número de células por área (“Célis/Área”) seja calculado.

3.6.2. Análise dos dados

Os dados demográficos e clínicos dos indivíduos foram organizados utilizando o software Microsoft Office Excel e analisados, quando passível de comparação entre grupos, pelo *Graph Pad Prism* 10.0 (GraphPad Software, Boston) utilizando o teste Mann-Whitney. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Os dados resultantes da análise de imuno-histoquímica foram analisados utilizando-se o programa *Graph Pad Prism* 10.0 (GraphPad Software, Boston) e a comparação entre os dois grupos foi feita utilizando o teste Mann-Whitney. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

A integração dos dados gerados por este estudo com os obtidos em nosso trabalho anterior (incluindo a frequência de ASC, plasmoblastos e plasmócitos circulantes obtidos por meio de citometria de fluxo) foi realizada por meio da construção de gráficos de correlação utilizando programa R (versão 4.2.3) implementado no software RStudio (versão 03.0+386). Os dados foram padronizados para um *score z* com a função “scale” (versão 4.2.3) para normalizar os intervalos entre os diferentes resultados. Gráficos de correlação com coeficiente de correlação de pontos de Spearman

(r) ao longo de todos os parâmetros pareados foram criados com o pacote “corrplot” (versão 0.92) (127). Os valores p bicaudais da classificação de Spearman foram calculados com “corr.mtest” e representados graficamente (valores p: *p \leq 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001), conforme já descrito em publicações anteriores (128,129).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Casuística

4.1.1. Casos de febre amarela

Neste estudo foram incluídos 24 casos de febre amarela que foram a óbito, todos sendo do sexo masculino e com mediana de idade de 47 anos (variando de 25 a 71 anos). A febre amarela foi definida por quadro clínico compatível e confirmada pela detecção do RNA viral em plasma por PCR e/ou sorologia positiva (IgM) para o YFV, além de imuno-histoquímica de tecido *post mortem* para verificar a presença do vírus (Tabela 1 e 2). Os principais dados demográficos, sintomas clínicos e resultados de exames laboratoriais estão apresentados na Tabela 3. Os sintomas clínicos e exames laboratoriais apresentados aqui foram coletados durante a visita de inclusão na pesquisa, ocorrida na admissão do paciente no hospital, que variou entre 3 e 12 dias após início de sintomas, conforme relatado durante anamnese. Esses pacientes fazem parte da coorte de casos de infectados pelo YFV cujos dados foram previamente publicados pelo nosso grupo (15). Em todos os casos, a autópsia definiu como causa básica do óbito a febre amarela, causando hepatite fulminante típica da doença grave, tendo como causa imediata principal a hemorragia visceral, principalmente no trato gastrointestinal e pulmonar.

Tabela 3. Dados clínicos e demográficos dos indivíduos naturalmente infectados pelo YFV que foram a óbito (n=24).

Dados demográficos e epidemiológicos	
Idade (anos), mediana (IQR)	47 (35 – 63)
Sexo: Masculino (%)	24 (100%)
Feminino (%)	0 (0%)
Etnia: Branco (%)	17 (70,8%)
Não-Branco (%)	7 (29,2%)
Intervalo (dias) entre início de sintomas e óbito, mediana (IQR)	11 (9 – 13)
Sintomas Clínicos	
Febre [#] (%)	21 (87,5%)
Dor Abdominal [#] (%)	13 (54,2%)
Dor de Cabeça [#] (%)	16 (66,7%)

Artralgia [#] (%)	6 (25,0%)
Mialgia [#] (%)	17 (70,3%)
Icterícia [#] (%)	12 (50,0%)
Sangramento [#] (%)	9 (37,5%)
Oligúria ^{&} (%)	8 (33,3%)
Exames Laboratoriais	
Diagnóstico de febre amarela ⁺ : PCR (%)	21 (87,5%)
IHQ* (%)	8 (33,3%)
IgM (%)	2 (8,3%)
Carga Viral, log ₁₀ (Cópias/ml), mediana (IQR)	5,49 (5,04 – 6,43)
Leucócitos [#] (por µl), mediana (IQR)	4690 (3800 – 11220) [°]
Linfócitos [#] (por µl), mediana (IQR)	800 (490 – 1570) [°]
Neutrófilos [#] (por µl), mediana (IQR)	3600 (2810 – 8720) [°]
Plaquetas [#] (por µl), mediana (IQR)	66000 (44000 – 93000) [°]
Creatinina [#] Sérica (mg/dl), mediana (IQR)	4,2 (3,0 – 5,3) [°]
Bilirrubina [#] Sérica (mg/dl), mediana (IQR)	5,6 (4,6 – 6,8) [°]
AST (IU/L), mediana (IQR)	6357 (3781 – 16785) [°]
ALT (IU/L), mediana (IQR)	2501 (1634 – 5387) [°]

*IHQ – Imuno-histoquímica de tecido realizada *post mortem*.

[#]Informação faltante para um indivíduo.

[&]Informação faltante para oito indivíduos.

⁺Para alguns casos foram feitos mais de um teste diagnóstico confirmatório.

[°]Valores de referência encontrados para homens adultos brasileiros e saudáveis: leucócitos 2843-9440/µl, linfócitos 720-3370/µl, neutrófilos 576-5971/µl, plaquetas 140-450 x10³/µl, creatinina 0,7-1,2 mg/dl, bilirrubina 0,2-1,0 mg/dl, AST <41 IU/L e ALT <41 IU/L (130,131).

4.1.2. Controles

O grupo controle foi composto de dez indivíduos sem quadro infeccioso agudo que foram atendidos no HC-FMUSP. Todos foram submetidos à esplenectomia por laparotomia exploratória devido a trauma abdominal, o que possibilitou a coleta de fragmentos deste órgão. Esse grupo é composto por nove indivíduos do sexo masculino e uma paciente do sexo feminino; a mediana de idade do grupo é de 25 anos (variando de 22 a 40). Os dados demográficos estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados demográficos do grupo controle (n=10).

Voluntário	Idade	Sexo	Trauma
1	23	M	Auto X Poste
2	29	M	Moto X Moto
3	23	M	Moto X Poste
4	40	M	Queda Altura
5	25	M	Moto X Auto
6	24	M	Moto X Auto
7	22	M	Moto X Auto
8	29	M	Moto X Auto
9	25	M	Moto X Poste
10	37	F	Queda Altura

Este grupo é significativamente mais jovem quando comparado ao grupo que foi a óbito após infecção natural pelo YFV ($p = 0,0001$). Apesar da diferença de idade entre os dois grupos, a maioria dos indivíduos do grupo YFV estava abaixo dos 60 anos de idade (17 dos 24 indivíduos), não sendo considerados idosos. Com relação à minoria dos indivíduos idosos neste mesmo grupo (7 dos 24 indivíduos), é importante ressaltar que os subtipos de linfócitos T encontrados no baço são semelhantes entre indivíduos adultos e idosos, como revisado por Kumar e colaboradores (132). O subtipo de linfócitos T efetores terminais (Temra, do inglês, *Effector Memory T Cells Re-expressing CD45RA*) são os que possuem maior aumento em proporção ao longo dos anos neste órgão, podendo ser explicado pela frequência do encontro de antígenos ao longo da vida, o que irá proporcionar a diferenciação dos linfócitos T *naïve* em linfócitos de memória efetores específicos, fazendo com que essa população cresça (132). Com relação aos subtipos de linfócitos B, não há, de acordo com a literatura, diferença na frequência entre o sangue periférico de indivíduos adultos e idosos, ressaltando apenas o decaimento da proporção de linfócitos B *naïve* em indivíduos mais velhos, fazendo com que a frequência de linfócitos B totais também apresente um valor reduzido (133,134), porém sem diminuir a capacidade destes indivíduos de gerar um repertório de células B específicas, ainda que tais células sejam consideradas menos eficientes devido à menor taxa de hipermutação somática, pela imunossenescência de

células T e diminuição da expressão da enzima AID (135), responsável pelo processo de troca de isotipo, que se mantém preservado (136).

4.2. Análise do relatório anatomopatológico do baço dos indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV

Os 24 óbitos por YFV tiveram autópsia realizada no SVOC-SP, sendo que foi possível acessar os dados dos laudos de autópsia de 23 indivíduos que estavam disponíveis. Do óbito até a realização da autópsia, o tempo variou de 4h20min a 13h14min. De acordo com os laudos, foram relatadas com destaque algumas alterações com relação ao aspecto e características do baço. O órgão foi pesado e a mediana de peso encontrada para os indivíduos foi de 248 gramas, variando de 90 gramas a 454 gramas. Como consta nos próprios laudos de autópsia e também conforme relatado na literatura, o peso médio de um baço humano saudável é de 150 gramas (137). Sendo assim, é possível observar que a maioria dos indivíduos se encontrava com o baço aumentado, com 17 indivíduos possuindo peso de baço superior a 200 gramas, e sete desses 17 indivíduos com peso de baço superior a 300 gramas, sendo considerada uma esplenomegalia significativa (94). Essa alteração no aspecto macroscópico do baço não foi relatada em estudos prévios e publicados do início do século 20, os quais descreveram que apesar das modificações microscópicas, não foram observadas alterações de peso ou tamanho do órgão após óbito decorrente de febre amarela (106,107). A esplenomegalia observada, pode ser atribuída à intensa congestão e hemorragia, à hiperplasia de células sinusoidais e à esplenite observada nos casos descritos neste trabalho.

Ao exame macroscópico, foi observado que a maioria dos indivíduos possuía a cápsula fibrosa de tecido conjuntivo do baço lisa, sendo que 4 indivíduos apresentavam a cápsula brilhante e com sinais de congestão. As trabéculas foram caracterizadas como normais em metade dos indivíduos e o parênquima como vinhoso e amolecido na maioria dos casos, alguns já apresentando congestão visível e aspecto friável do órgão, como já descrito em estudos anteriores (107). A congestão é um achado importante que indica o aumento do volume de sangue no tecido e que tem como uma das causas o comprometimento do efluxo sanguíneo do órgão, o que pode ser responsável também pelo aspecto friável que foi achado característico no baço destes pacientes.

À microscopia foi identificada hemorragia e congestão em todos os casos, isquemia difusa da polpa vermelha em 12 casos e esplenite em 14 casos. Em quatro

casos, os patologistas responsáveis pela autópsia observaram hialinização e alterações fibrinoides das arteríolas centrais, processos que aumentam a espessura da parede arteriolar e reduzem a luz da arteríola, podendo levar a isquemia (138). Tal processo se intensifica com o aumento da idade e está, ao que tudo indica, relacionado com o extravasamento de plasma por meio de células endoteliais lesionadas, o que pode ocorrer devido à distúrbios hemodinâmicos, como a hipertensão (138).

A região da polpa branca apresentou hipoplasia ou depleção linfóide em 20 indivíduos, e em 15 desses casos também foi observada hemofagocitose. A hipoplasia no baço de indivíduos e primatas não-humanos infectados pelo YFV já foi previamente observada e descrita (106,107,111). O processo de hemofagocitose pode acontecer de duas formas, ou por uma condição genética ou por uma via secundária, por exemplo decorrente de uma infecção, condição mais prevalente em adultos, também comumente conhecida como síndrome da ativação de macrófagos (139). A hemofagocitose secundária é comum em casos de sepse e já está bem caracterizada para infecções pelos vírus herpes, parvovírus e influenza, e é desencadeada por uma resposta exacerbada do hospedeiro, como por exemplo a síndrome da tempestade de citocinas (139), esta última ainda não bem caracterizada especificamente para infecções pelo YFV, porém sugerida em estudo recente relatando grande quantidade de citocinas pró e anti-inflamatórias nos corações dos indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV (140) e, já observada para infecções graves por outros orthoflavivírus, como DENV e, neste caso, altamente correlacionada com a disfunção endotelial e extravasamento de plasma (141,142). Em todos os casos de febre amarela foi observada a expressão de antígenos do YFV em células mononucleares, tanto da polpa branca (Figura 9), quanto da polpa vermelha do baço.

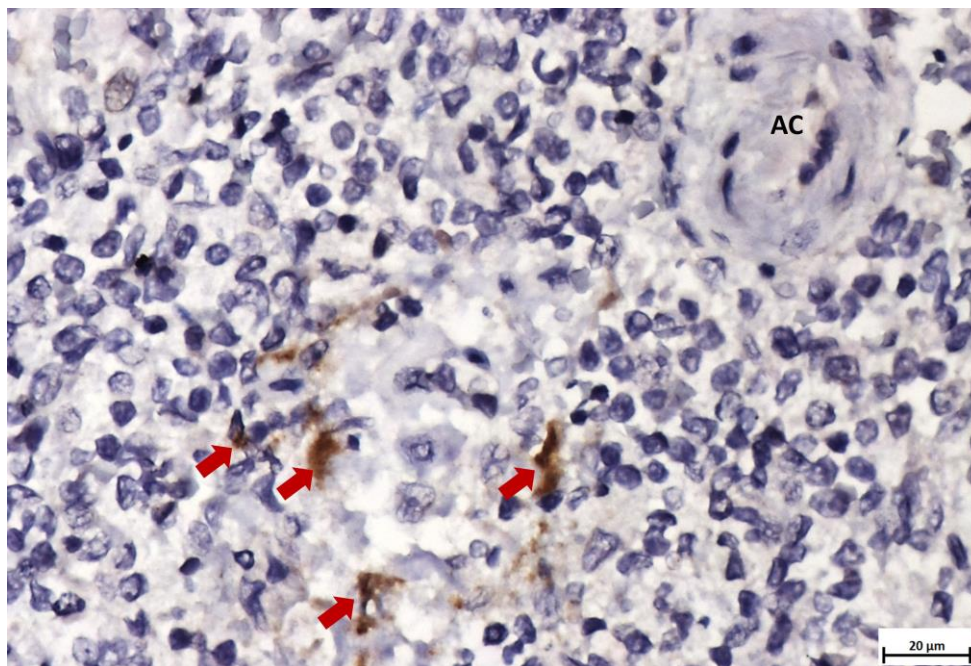


Figura 9. Fotomicrografia de baço imunomarcado para antígenos do YFV.

NOTA: Região adjacente à arteríola central (AC) da polpa branca do baço de indivíduo que foi a óbito após infecção pelo YFV. As setas vermelhas apontam as células imunomarcadas para antígenos do YFV. Cortes 4 μ m. Coloração: Hematoxilina de Carazzi. Aumento de 400X.

4.3. Análise histológica das alterações esplênicas nos grupos esplenectomia e febre amarela

As alterações histológicas foram avaliadas na polpa branca dos grupos de indivíduos que foram a óbito após infecção natural pelo YFV e indivíduos que passaram por esplenectomia pós-trauma abdominal sem infecção aguda no momento da retirada do baço. A análise foi realizada na polpa branca, especificamente na região adjacente à arteríola central, visto o intuito deste projeto em caracterizar a imunidade *in situ* dos indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV. Essa região é rica em células do sistema imune e é na bainha periarteriolar, região que envolve a polpa branca adjacente à arteríola central (PALS) e folículos adjacentes à arteríola central, onde ocorre a proliferação de linfócitos T e B, e também onde são formados os centros germinativos, importante etapa de desenvolvimento para construção da resposta imune protetora (92,93).

À primeira vista, foi possível observar hipoplasia da polpa branca, ou seja, diminuição da população celular do tecido, nos fragmentos de baço dos indivíduos que foram a óbito após a infecção pelo YFV quando comparado com o grupo controle (Figura 10). Essa hipoplasia celular aparente apresentava-se acompanhada de

hemorragia marcante na polpa branca, achado proeminente no grupo febre amarela (Figura 10B).

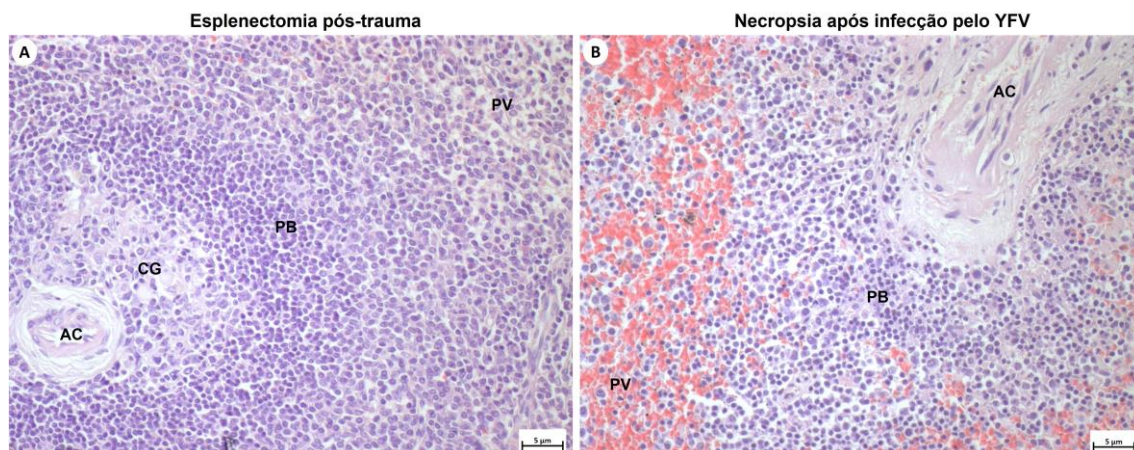


Figura 10. Fotomicrografias de baço representativas dos grupos esplenectomia e febre amarela.

NOTA: **A.** Região adjacente à arteríola central (AC) da polpa branca (PB) de um fragmento de baço do grupo que passou por esplenectomia pós-trauma. Centro Germinativo (CG). Polpa vermelha (PV). **B.** Região adjacente à arteríola central (AC) da polpa branca (PB) de um fragmento de baço do grupo que foi a óbito após infecção pelo YFV. Polpa vermelha (PV). Cortes 4 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento de 200X.

Na análise histológica dos dois grupos também se notou a desorganização da região da polpa branca no grupo febre amarela que, diferente do observado no grupo controle, no qual foi possível observar centros germinativos bem delimitados e uma clara separação entre polpa branca e polpa vermelha, os indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV apresentavam aparente aumento da arteríola e uma separação difusa entre polpa branca e polpa vermelha com grande presença de hemácias (Figura 10).

O relato de caso publicado em literatura sobre dois indivíduos que foram a óbito após eventos adversos graves pós-vacinação com 17DD identificou congestão, hemorragia e hipoplasia da polpa branca, bem como a presença de antígeno da febre amarela no baço (51). Já com relação à infecção natural pelo YFV, observou-se que os baços de indivíduos dessa coorte que foram a óbito apresentaram hipoplasia linfóide, citofagocitose, e esplenite (112).

A presença de citofagocitose na polpa branca, bem como a necrose de centros germinativos também foram achados relatados em macacos *Rhesus* necropsiados 14 dias após infecção com a cepa selvagem YFV- DakH1279 (111). Já em macacos bugio naturalmente infectados com o YFV foi identificada congestão, hemorragia e autólise no baço (143), e em macacos-esquilo infectados com a cepa selvagem BeH655417, foram evidenciados pontos hemorrágicos na polpa branca e vermelha (144). Outra

que o grupo febre amarela possui área da polpa branca adjacente à arteríola central menor do que o grupo controle ($p < 0,0001$) (Figura 13).

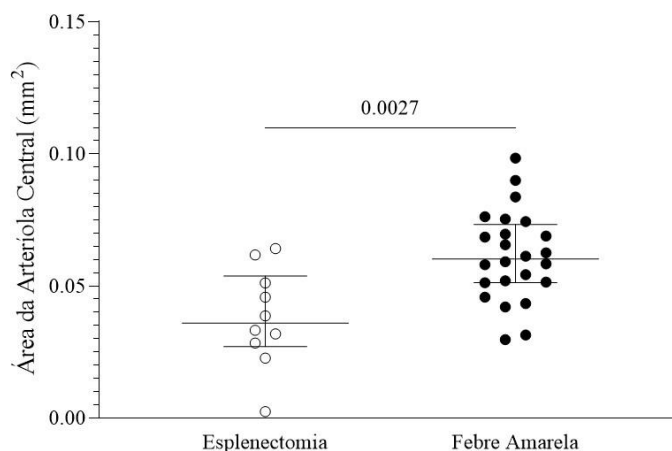


Figura 12. Área da arteríola central (mm²).

NOTA: Grupo esplenectomia (n = 10) e grupo febre amarela (n = 24). Valor de p = 0,0027.

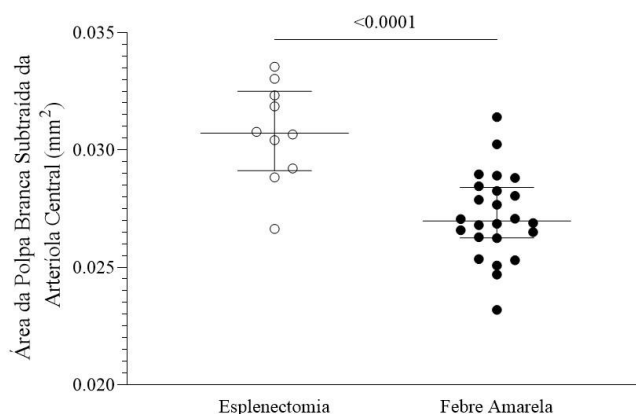


Figura 13. Área da polpa branca após subtração da área da arteríola central (mm²).

NOTA: Grupo esplenectomia (n = 10) e grupo febre amarela (n = 24) Valor de p < 0,0001.

É comum que ocorra vasodilatação durante processos inflamatórios, como ocorre, por exemplo, nas infecções, para que se aumente o fluxo de sangue para determinadas regiões e, com isso, aumente também o influxo de células do sistema imune (148,149). Apesar de se tratar de uma resposta fisiológica, a exacerbação da vasodilatação pode ser prejudicial, pois o aumento dos compostos produzidos para que ocorra esse processo pode levar a um aumento da inflamação e a uma hipotensão sistêmica, assim como ocorre durante o choque séptico, acarretando na hipoperfusão dos órgãos (148).

Diversos compostos químicos podem ser responsáveis pela vasodilatação, sendo um dos principais o óxido nítrico (NO, do inglês, *nitric oxide*) que é produzido em sua maioria, pelas células endoteliais, tendo como finalidade o relaxamento do músculo liso

(148,149), como também importante papel no processo de apoptose celular (150). Em casos de infecções pelo vírus da dengue, alguns fatores de vasodilatação, incluindo o NO, foram associados a formas graves da doença (150,151). Nos casos graves de dengue hemorrágica, o NO foi associado ao extravasamento de plasma, apesar de também já ter sido descrito como um fator protetor por auxiliar no efeito das citocinas antivirais, contexto ainda pouco estudado (152).

Outras observações que se relacionam ao tamanho da arteríola central, previamente relatadas para quatro casos no relatório anatomopatológico, são a hialinização e as alterações fibrinoides das arteríolas centrais, que acarretam o espessamento da arteríola e diminuição de sua luz, podendo levar à congestão e isquemia do órgão, este último sendo um processo relatado para maioria dos casos de febre amarela deste projeto, incluindo os quatro casos em que foi observado o processo fibrinoide das arteríolas centrais.

4.4. Análise da resposta imune *in situ* do baço

Para melhor explorar os achados sobre as alterações histológicas observadas na polpa branca, compartimento esplênico criticamente envolvido na geração da resposta imune, e assim tentar entender que braços dessa resposta estariam comprometidos na infecção pelo YFV, foram realizadas reações de imuno-histoquímica para definir quantitativamente a presença de 19 marcadores na região da polpa branca adjacente à arteríola central nos fragmentos de baço dos indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV e de indivíduos que passaram por esplenectomia pós-trauma. A análise foi realizada com o auxílio do Dr. Amaro Nunes Duarte Neto, especialista patologista e colaborador de nosso projeto.

4.4.1. Marcadores celulares comuns da resposta imune

A quantificação do marcador CD45, também conhecido como marcador “pan-leucocitário”, por ser expresso por todos os leucócitos, não apresentou diferenças significativas entre os grupos de febre amarela e esplenectomia ($p = 0,1928$) (Figura 14A, B e E), bem como a quantificação do marcador CD39 ($p = 0,0855$) (Figura 14C, D e E), primariamente descrito como marcador de ativação de linfócitos B (153), porém também expresso na maioria dos leucócitos, como células NK, células dendríticas, macrófagos e células T ativadas (121,154).

A expressão de CD45 é essencial para a persistência de centros germinativos e é também crucial para a sobrevivência de alguns tipos celulares, como por exemplo, células B. Apesar disso, a interação entre esse marcador e o linfócito B não é necessária para que ocorram processos fundamentais para o desenvolvimento da resposta imune protetora, como a SHM ou a seleção de clones com maior afinidade (155). Embora a diminuição da polpa branca tenha sido indicada pela diminuição de células CD45⁺ em indivíduos que foram a óbito após infecção por SARS-CoV-2 (156), nos casos de óbito após infecção pelo YFV avaliados neste estudo, a diminuição da área de polpa branca subtraída da arteríola central (Figura 13) não foi associada à redução de células CD45⁺ (Figura 14A, B e E).

O marcador CD39 é uma enzima de superfície que, em conjunto com o marcador CD73, também uma ectonucleotidase, possibilita a conversão de ATP em ADP e cAMP, sendo sua expressão estimulada por citocinas pró-inflamatórias (121). A expressão dessa molécula foi associada ao controle da resposta efetora de células T CD4⁺ e CD8⁺, através da produção de ADP e cAMP, e sua ausência acarreta a desregulação do tráfego de macrófagos e a manutenção do estado inflamatório e produção de citocinas (121). A maioria das células T reguladoras expressa CD39 e, com o auxílio desse marcador, migram para regiões inflamadas, onde conseguem controlar o nível de ATP extracelular, convertendo essas moléculas e diminuindo a morte celular na região (157). Um estudo recente demonstrou que indivíduos que sobreviveram ao estado de sepse possuíam uma grande quantidade de plasmoblastos expressando CD39, responsáveis por aumentar os níveis de ADP circulante, suprimindo a resposta imune do hospedeiro e o deixando susceptível à novas infecções (158). Apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa na quantidade de células expressando CD39 entre os dois grupos avaliados neste estudo, a mediana dos dois grupos foi bastante distinta (1252 células/mm² para o grupo esplenectomia e 2138 células/mm² para o grupo febre amarela). Esta constatação, aliada ao papel do CD39 descrito nos casos de sepse, reforça a importância de que esse marcador continue a ser explorado na imunopatogênese de infecções e em processos inflamatórios na oportunidade de outros estudos.

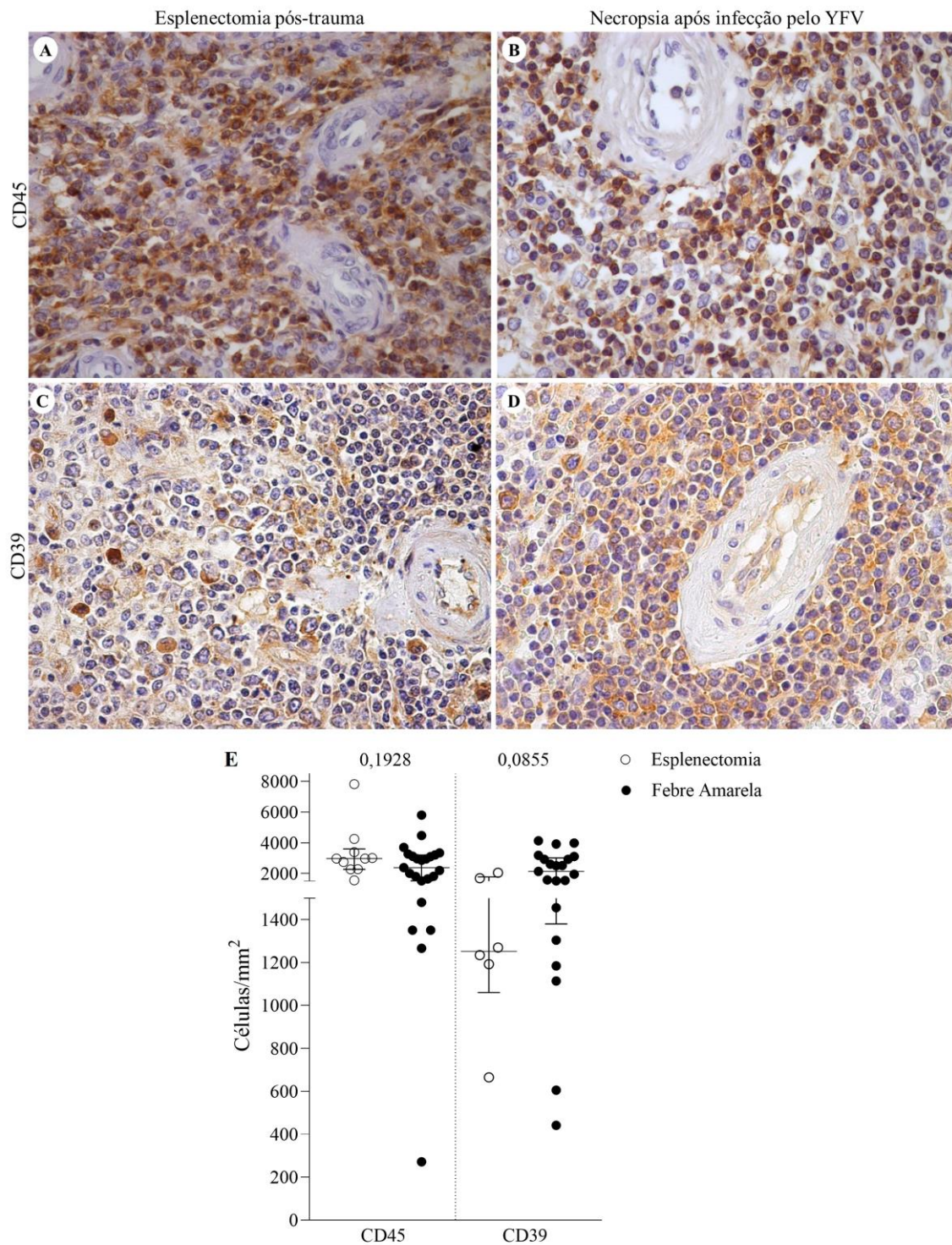


Figura 14. Imunomarcção para CD45 e CD39.

NOTA: **A.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-CD45. **B.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-CD45. **C.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-CD39. **D.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-CD39. Cortes 4 μ m. Coloração: Hematoxilina de Carazzi. Aumento de 400X. **E.** Avaliação quantitativa de células CD45⁺ CD39⁺ nos grupos de esplenectomia (controle) e febre amarela utilizando teste de Mann-Whitney. No gráfico são representadas as medianas para cada marcador e grupo com o intervalo interquartil.

4.4.2. Marcadores da resposta imune inata

O CD68 e o NK foram considerados como marcadores da resposta imune inata por compreenderem receptores de células majoritariamente envolvidas na resposta inata. O marcador CD68, clássico para identificação de macrófagos, se mostrou significativamente diminuído no grupo febre amarela em comparação ao grupo controle de esplenectomia ($p = 0,0003$) (Figura 15A, B e E). Já o marcador NK, representativo das células de mesmo nome, não apresentou diferença entre os dois grupos aqui analisados ($p = 0,2092$) (Figura 15C-E).

Em consonância com os achados deste estudo, a análise de baços de indivíduos que foram a óbito após infecção por SARS também apontou uma diminuição de quase 40% de macrófagos CD68⁺ no baço quando comparado com indivíduos não infectados, apresentando também tamanho celular mais do que 2 vezes superior do que o macrófagos encontrados em baços de indivíduos que foram a óbito devido à trauma (159), podendo indicar uma sobrecarga das células que estavam em menor número. Outro estudo envolvendo indivíduos que foram a óbito após infecção pelo SARS-CoV-2 identificou um número aumentado de macrófagos mortos no baço quando comparado a casos de óbito não associados à COVID-19, indicando que a autofagia de macrófagos nesses casos, poderia estar comprometida, fazendo com que as células mortas continuassem no tecido (160).

Os macrófagos presentes no baço são responsáveis pela remoção de resíduos de células mortas, regulação das células vizinhas e produção de diversas citocinas importantes para a resolução de infecções (74). Ao contrário do observado neste trabalho, que demonstrou uma redução na contagem de macrófagos expressando CD68 na polpa branca do baço em indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV, um estudo brasileiro prévio observou que nos rins de indivíduos com febre amarela que foram a óbito havia um aumento de macrófagos expressando CD68 com características anti-inflamatórias além da alta presença do antígeno YFV no órgão (161). Outro estudo realizado no Brasil utilizando amostras de fígado de indivíduos que tiveram óbito confirmado para febre amarela relatou que células expressando CD68 estavam aumentadas na porção mais central do órgão quando comparado com indivíduos não infectados (162). Os achados destes dois estudos, em conjunto com observado neste trabalho, sugerem que a diminuição de macrófagos CD68⁺ no baço pode ser reflexo de um influxo dessas células derivadas de órgãos do sistema reticuloendotelial (linfonodos, baço e medula óssea) para outros órgãos para o qual o YFV possui tropismo, incluindo

os rins e o fígado (64), a fim de se combater o vírus nestes tecidos e os danos locais derivados. Interessantemente, o processo de hemofagocitose que foi identificado durante a autópsia em 8 indivíduos desta coorte tem como característica o aumento de macrófagos CD68⁺ no baço e no fígado (163), porém aqui, a mediana de contagem dessas células nos baços do grupo febre amarela foi bem inferior à do grupo esplenectomia, podendo estar relacionada com a saída dessas células do baço para outros órgãos, como os acima mencionados.

As células NK representam em torno de 10% das células do sangue periférico e estão presentes em grande quantidade nos órgãos linfoides primários e secundários (164,165), como o baço. Apesar disso, a localização dessas células se mantém quase que exclusiva na polpa vermelha quando em estado de homeostase, não sendo identificada na região de PALS ou nos folículos da polpa branca (165). A presença das células NK na polpa vermelha tem grande relação com as interações entre essas células e macrófagos, bem como com células dendríticas, orquestrando assim o desenvolvimento da resposta inata (165). Sendo assim, a falta de aumento dessas células na polpa branca do baço é esperada, visto que a polpa branca não é de comum localização dessas células, ainda mais quando os macrófagos, que interagiriam com elas, estão gravemente depletados na polpa branca dos indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV.

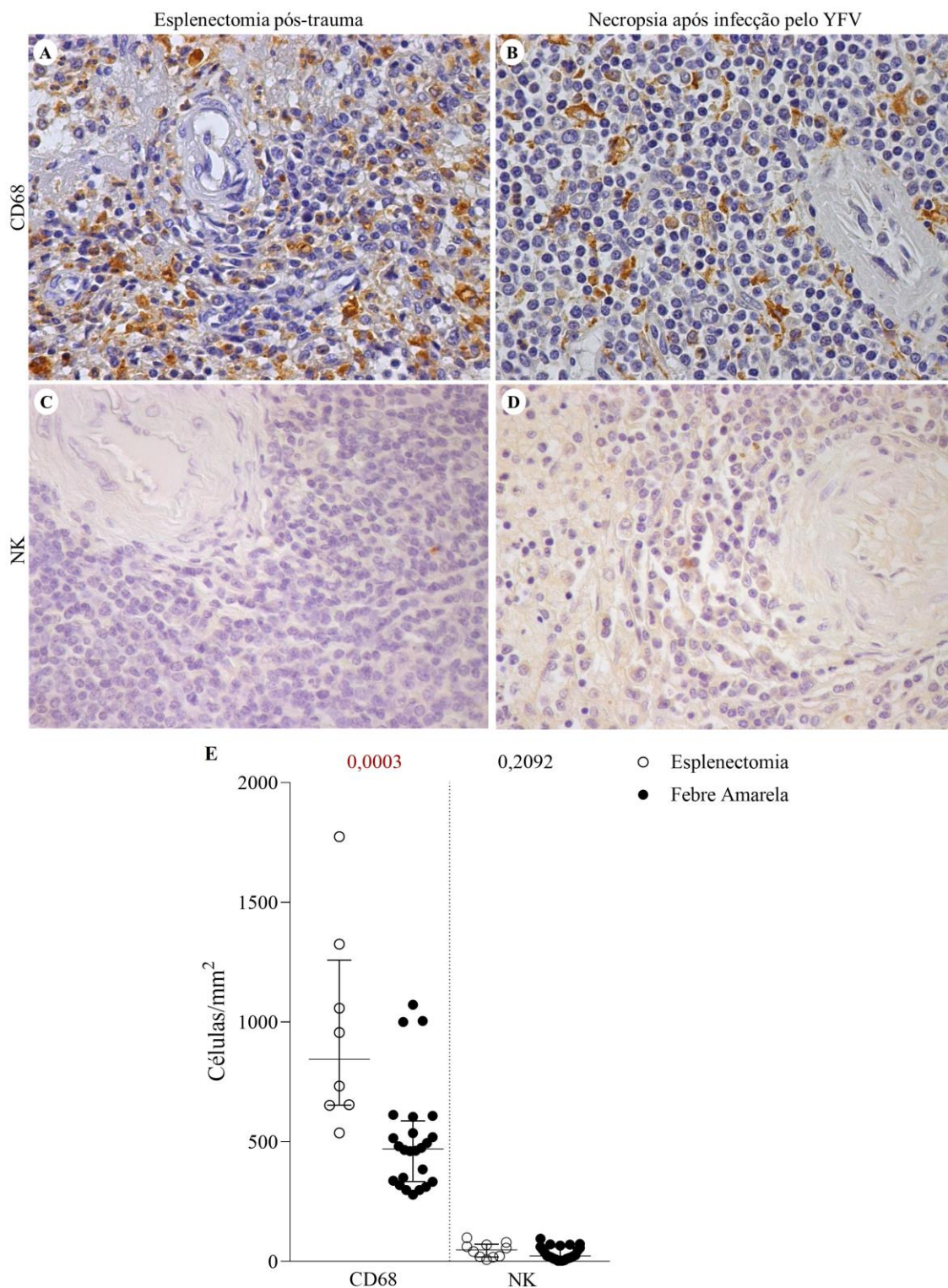


Figura 15. Imunomarcção para CD68 e NK.

NOTA: **A.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-CD68. **B.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-CD68. **C.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-NK. **D.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-NK. Cortes 4 μ m. Coloração: Hematoxilina de Carazzi. Aumento de 400X. **E.** Avaliação quantitativa de células CD68⁺ e NK⁺ nos

grupos de esplenectomia (controle) e febre amarela utilizando teste de Mann-Whitney. No gráfico são representadas as medianas para cada marcador e grupo com o intervalo interquartil.

4.4.3. Marcadores da imunidade adaptativa

4.4.3.1. Células T

Os marcadores CD3 e Foxp3 são marcadores especificamente expressos por células T. Neste estudo foi observado que tanto o marcador CD3 quanto o Foxp3 apresentaram quantificação significativamente inferior no grupo febre amarela quando comparado com o grupo esplenectomia ($p < 0,0001$ e $p = 0,0020$, respectivamente) (Figura 16E). O marcador CD3 é comumente utilizado para identificação de linfócitos T e, apesar de apenas uma pequena porção das células encontradas nos centros germinativos serem linfócitos T, essa população celular é essencial para a conservação e maturação de afinidade de imunoglobulinas durante as respostas T dependentes (166). A área escolhida para quantificação de células T (CD3⁺) contempla a zona de linfócitos T, também conhecida como PALS, região altamente populada por esses linfócitos e onde ocorre a interação delas com células dendríticas e linfócitos B, estas em processo de migração para a borda dos folículos, também presentes na região periarteriolar (92).

A diminuição de células CD3⁺ no baço pode significar uma depleção do sistema imune nestes indivíduos acometidos pela febre amarela (Figura 16A-B) e é geralmente observada em casos de sepse (146). A redução de células CD3⁺ na região periarteriolar da polpa branca também foi identificada em indivíduos que foram a óbito após infecção pelo SARS-CoV-2 e associada ao desenvolvimento de COVID-19 grave (167). Um estudo em macacos *Rhesus* infectados com uma cepa selvagem do vírus da febre amarela (YFV-DakH1279) relatou a presença de linfopenia, tanto em sangue periférico quanto no tecido linfático, que também estava acompanhada da necrose de centros germinativos nos animais em que a eutanásia foi necessária antes do término do período do estudo, caracterizando os casos graves da doença (111).

Não há estudos demonstrando a cinética de células T após infecção pelo YFV, porém estudos realizados após a vacinação, utilizando a vacina 17D, demonstram que duas semanas após a administração da vacina há um aumento da frequência de células CD4⁺ (63) e CD8⁺ (65) na circulação, que decai a valores basais quatro semanas após vacinação. Apesar do pico de expansão das células T na periferia se apresentar após duas semanas, um estudo demonstrou que durante os 10 primeiros dias após a vacinação com 17D acontece um decaimento de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, especialmente os que expressam CCR7, um importante marcador migratório, podendo significar o

direcionamento dessas células para órgãos linfoides secundários, como o baço (168), porém essa característica observada em vacinados se correlacionou com uma pior resposta protetiva desses indivíduos.

Em nosso estudo, obtivemos a contagem de células CD3⁺ total na polpa branca adjacente à arteríola central dos indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV, os quais possuíam mediana de dias entre início de sintomas e óbito de 11 dias, e é possível que uma parcela dos linfócitos T tenham migrado para periferia ou mesmo para outros órgãos, com a finalidade de realizar uma resposta efetora contra o vírus, embora este estudo não permita diferenciar quais linfócitos T estão especificamente na região da polpa branca analisada nos dois grupos. Apesar disso, a subpopulação de células expressando Foxp3, comumente caracterizadas como células T reguladoras, também se encontrava diminuída (Figura 16C-D e E), podendo ter, em parte, acarretado a diminuição de células expressando CD3 no baço.

As células Foxp3⁺, conhecidas como células T reguladoras, são uma subpopulação das células T CD4⁺ de extrema importância para a manutenção e homeostase da resposta imune (68). Em estado de homeostase, as células expressando Foxp3 correspondem em torno de 15% da população de células expressando CD4 no baço, sendo mais presentes na região de PALS (68,169). Em centros germinativos, essas células se mantêm devido à expressão de Blimp-1 e Bcl-6, dois fatores de transcrição essenciais para a formação de centros germinativos, indicando assim que as células T reguladoras no baço tem papel fundamental na regulação das respostas de células B e T (68). Após a vacinação com 17D foi relatado o aumento da ativação de células Foxp3⁺ no sangue periférico, com pico de ativação no décimo dia pós-vacina, porém sem que houvesse o aumento da quantidade dessas células (69). Contudo, foi identificado um influxo de células T reguladoras no rim de indivíduos que foram a óbito após infecção por YFV, sugerindo a tentativa de se promover a regulação da resposta para diminuir a inflamação no órgão (161). Essas observações em conjunto com a depleção de células expressando Foxp3 identificadas neste estudo pode ser mais um indício de que há um influxo de células imune derivadas de órgãos linfoides secundários, como o baço, para outros locais que necessitam de um controle mais imediato da infecção, acarretando um prejuízo da resposta imune em desenvolvimento no baço, possivelmente levando ao desbalanço dessa resposta e, conseqüentemente, ao óbito desses indivíduos.

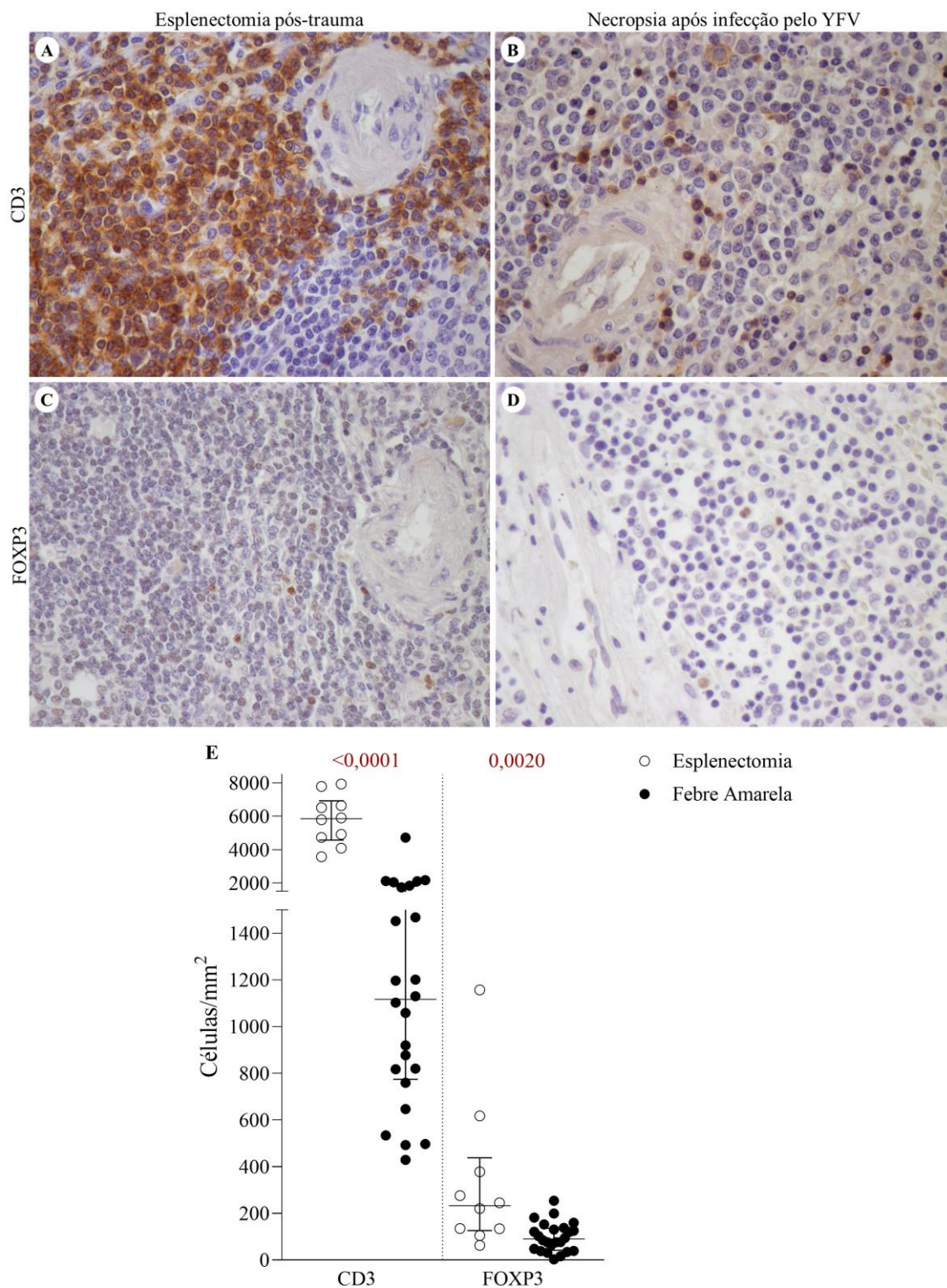


Figura 16. Imunomarcção para CD3 e Foxp3.

NOTA: **A.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-CD3. **B.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-CD3. **C.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-Foxp3. **D.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-Foxp3. Cortes 4 μ m. Coloração: Hematoxilina de Carazzi. Aumento de 400X. **E.** Avaliação quantitativa de células CD3⁺ e Foxp3⁺ nos grupos esplenectomia (controle) e febre amarela utilizando teste de Mann-Whitney. No gráfico são representadas as medianas para cada marcador e grupo com o intervalo interquartil.

4.4.3.2. Citocinas

A expressão das citocinas IL10, IL12, IL33 e IFN γ , bem como do receptor de IFN γ foi quantificada na região da polpa branca, porém nenhuma delas apresentou diferença entre o grupo febre amarela e esplenectomia (controle) ($p = 0,9457$, $p = 0,1705$, $p = 0,7804$, $p > 0,9999$ e $p = 0,4448$, respectivamente) (Figura 17). Apesar de se encontrarem dentro do tópico de imunidade adaptativa, essas citocinas e o receptor de IFN γ estão também envolvidos com a ação de células da resposta inata, bem como por células que não participam da resposta imune, por isso estes contextos de atuação também foram considerados na discussão destes resultados.

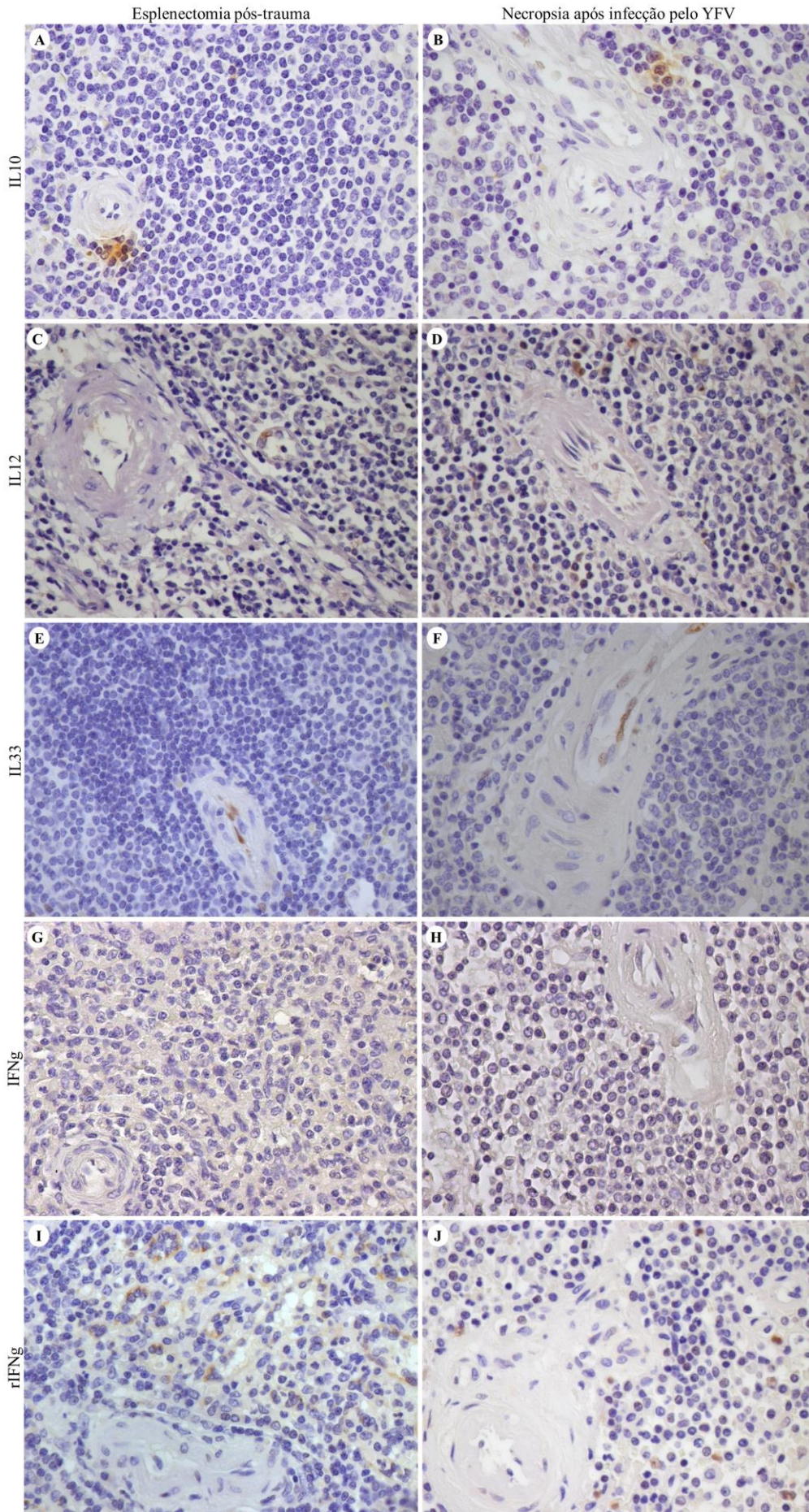
A IL10 é produzida por uma variedade de células leucocitárias, porém são as células T, os monócitos, os macrófagos e as células dendríticas que contribuem para a maior parte dessa produção, seguidos das células B, mastócitos e granulócitos, em condições específicas (123). O alvo desta citocina é, em especial, os monócitos e os macrófagos, os quais expressam receptor para IL10 que, mediante reconhecimento dessa citocina, diminuem suas funções de apresentação de antígeno, fagocitose e produção de mediadores anti-inflamatórios (123), com o potencial de direcionar para uma resposta anti-inflamatória do tipo Th2. Diferentemente, a citocina pró-inflamatória IL12 é comumente produzida por células apresentadoras de antígeno, incluindo células dendríticas e macrófagos, e a sua função tem como principais alvos as células T e NK ativadas, induzindo, por exemplo, a diferenciação de células T CD4⁺ em populações celulares com perfil Th1 (124). Já a citocina IL33 tem a maior parte de sua produção realizada por células epiteliais, as quais não fazem diretamente parte da resposta imune, porém têm importante papel na produção dessa molécula como forma de alarme para danos teciduais, bem como estimular a produção de citocinas e quimiocinas por células dendríticas e linfócitos T CD4⁺ (125). Por fim, a citocina IFN γ é sabidamente produzida por células T e NK ativadas e possui função de ativar macrófagos e aumentar a apresentação de antígenos, mediando respostas antivirais e coordenando o balanço entre as respostas Th1 e Th2 (122,170) através de seu receptor (rIFN γ), expresso por todos os tecidos do corpo, sendo no baço, especialmente encontrado em células das regiões da zona marginal e polpa vermelha e pouco detectado na zona de PALS e centros germinativos (126).

Até o presente momento não há, para nosso conhecimento, estudos que tenham avaliado a expressão dessas citocinas no baço de indivíduos infectados pelo YFV. No contexto da vacinação com 17D, foi observado o aumento significativo de IL10 no soro,

sete dias após a vacinação (47,83). Outro estudo demonstrou que, após a vacinação com 17DD, os indivíduos apresentaram aumento da expressão do receptor de IL10 (IL10R) por células da imunidade inata 15 dias após a vacinação (55). O aumento de monócitos IL10⁺ nos dias 15 e 30 após a vacinação, e, aumento de células NK IFN γ ⁺ também foram achados relatados no sétimo dia após a vacinação (171). Ao passo que houve uma diminuição de linfócitos T CD4⁺ IL10⁺ e IL12⁺ no dia 7 pós-vacinação, também ocorreu um aumento de linfócitos TCD4⁺ IFN γ ⁺, e, um aumento de linfócitos B IL10⁺ no décimo-quinto dia pós-vacinação, correlacionando positivamente com a soroconversão desses indivíduos (171), citocina crucial para a produção de IgG (172) e diferenciação dessas células em células plasmáticas (173), especialistas em produção de imunoglobulinas.

Quando observado o tecido renal de indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV, identificou-se um aumento significativo de células expressando IL10 e IFN γ após análises de imuno-histoquímica, revelando um perfil balanceado entre uma resposta anti- e pró-inflamatória, com características de reparo de dano tecidual (161). O mesmo foi relatado em um estudo também conduzido na Faculdade de Medicina da USP e, utilizando os mesmos indivíduos incluídos neste trabalho, demonstrando que a expressão de IL10 e IFN γ estava aumentada no coração de indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV quando comparado com casos de sepse (140). Já em um modelo *in vitro* de infecção utilizando as cepas Asibi e 17D em células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado), foi identificado que a cepa ancestral Asibi induziu a produção de citocinas maior do que a obtida pela infecção com a cepa vacinal 17D, sendo o pico de expressão de IL10 detectado 96h após inoculação (174).

Provavelmente a detecção da produção de citocinas no baço em casos de infecção pelo YFV seja bastante dificultada por se tratar de um órgão em que acontece uma grande saída de células da resposta imune para a circulação, em direção a outros sítios, com objetivo de promover a eliminação do vírus em órgãos preferencialmente infectados pelo YFV, como os rins e o fígado, e para mediar os efeitos secundários causados pela infecção. O baço é um órgão linfoide secundário que tem papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune, sendo essencial na ponte entre a resposta imune inata e adaptativa, porém, não sendo uma região destinada à residência permanente dessas células, estando, portanto, sujeito à constante renovação celular.



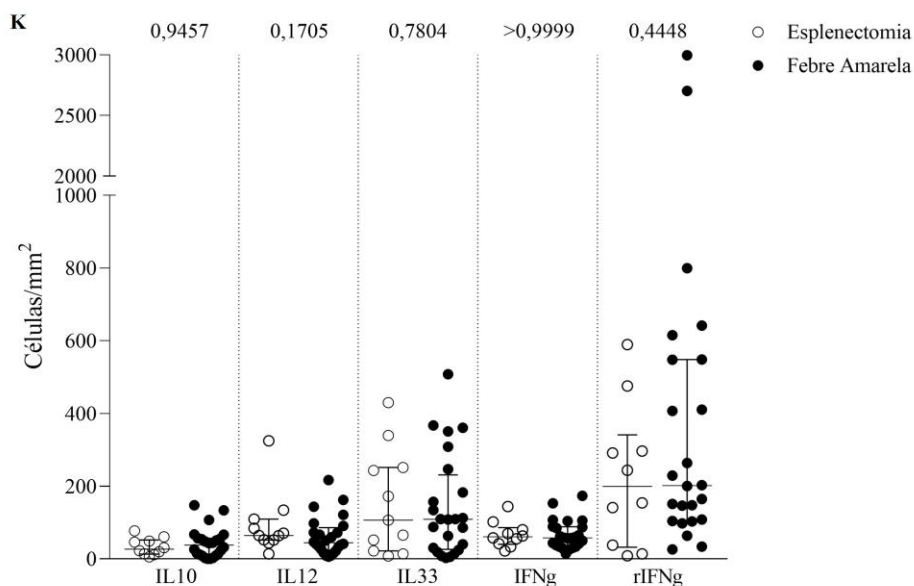


Figura 17. Imunomarcção para IL10, IL12, IL33, IFN γ e receptor de IFN γ .

NOTA: **A.** Região adjacente a arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-IL10. **B.** Região adjacente a arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-IL10. **C.** Região adjacente a arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-IL12. **D.** Região adjacente a arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-IL12. **E.** Região adjacente a arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-IL33. **F.** Região adjacente a arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-IL33. **G.** Região adjacente a arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-IFN γ . **H.** Região adjacente a arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-IFN γ . **I.** Região adjacente a arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-rIFN γ . **J.** Região adjacente a arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-rIFN γ . Cortes 4 μ m. Coloração: Hematoxilina de Carazzi. Aumento de 400X. **K.** Avaliação quantitativa de células IL10⁺, IL12⁺, IL33⁺, IFN γ ⁺ e rIFN γ ⁺ nos grupos esplenectomia (controle) e febre amarela utilizando teste de Mann-Whitney. No gráfico são representadas as medianas para cada marcador e grupo com o intervalo interquartil.

4.4.3.3. Células B

O marcador CD20, originalmente nomeado como B1, foi o primeiro marcador específico de células B a ser identificado (175). Este marcador é expresso a partir da fase de linfócitos pré-B e essa expressão é mantida durante o desenvolvimento que acontece nos folículos e centros germinativos, sendo perdida quando os linfócitos se diferenciam em plasmoblastos e terminalmente em plasmócitos (176). É sabido que a deficiência de CD20 leva a um número reduzido de células B de memória circulantes e também à diminuição dos níveis de anticorpos do tipo IgG, por reduzir o processo de troca de isotipo de imunoglobulinas (176), sendo uma molécula importante tanto para o desenvolvimento da resposta imune dependente de células T quanto para a resposta

independente dessas células, visto seu papel crítico para a sinalização adequada durante a ativação celular via BCR (do inglês, *B Cell Receptor*).

A quantificação de células CD20⁺ na região periarteriolar da polpa branca foi significativamente menor em indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV quando comparada com o grupo controle ($p = 0,0011$) (Figura 18A-B e E). A diminuição de células CD20⁺ é tipicamente observada na polpa branca de casos humanos de sepse (146). A diminuição dessas células também foi observada no baço da maioria dos indivíduos de uma coorte de infectados por SARS-CoV-2 que desenvolveram COVID-19 grave e foram a óbito (177). Nesse estudo, a depleção de células CD20⁺ foi associada à atrofia da polpa branca periarteriolar (o que também foi observado aqui pela quantificação da área da polpa branca subtraída da área da arteríola central) no grupo febre amarela quando comparado ao grupo esplenectomia. Em concordância com os achados deste estudo, a infecção de macacos *Rhesus* com a cepa selvagem do vírus da febre amarela YFV-DakH1279 diminuiu a quantidade de células CD20⁺ nos centros germinativos de macacos em que a eutanásia foi necessária antes do final do período do estudo, quando comparados com animais que sobreviveram à infecção (111), sendo um marcador de desenvolvimento da forma grave da doença nesses animais. A depleção linfóide geral dos folículos no baço também foi identificada nas infecções naturais pelo YFV em macacos Guigó (*Callicebus* spp) e infecção pela cepa selvagem YFV-DakH1279 em macacos *Rhesus*, principalmente relacionada à necrose linfóide e, neste último caso, se estendendo também para centros germinativos (108,178). Em conjunto, tais dados estão de acordo com a depleção de células CD20⁺ na polpa branca apresentadas neste trabalho com uma coorte de indivíduos naturalmente infectados pelo YFV.

O marcador CXCR5, expresso por linfócitos B nos folículos da polpa branca (92), também se mostrou diminuído no grupo febre amarela, quando comparado com o grupo esplenectomia ($p = 0,0002$) (Figura 18C-D e E). A ausência desse marcador em linfócitos B no baço impede que ocorra a migração até o folículo, visto que o CXCR5, em conjunto com outros marcadores, como o CCR7, garante o posicionamento correto dos linfócitos B e T nas bordas dos folículos, para que ocorra a interação entre essas duas células (92,95). A diminuição de células expressando CXCR5 em conjunto com a diminuição da quantidade de células expressando CD20 pode sugerir que parte dos linfócitos B depletados na polpa branca do baço são linfócitos B maduros localizados ou

em migração para os folículos, os quais farão parte da resposta T dependente, importante para o desenvolvimento de anticorpos com maior especificidade.

Após a vacinação com 17D foi identificado que os linfócitos T CD4⁺ expressando CXCR5 do sangue periférico de humanos, nomeados de linfócitos auxiliares foliculares circulantes, mantiveram-se com frequências estáveis e sem modificações até 28 dias após a vacina, sendo, porém, detectado o aumento de um subgrupo dessas células expressando CXCR3 (um marcador que discrimina migração) a partir do dia 14 após a vacinação (83). Nesse mesmo estudo, as células B de memória expressando CXCR5 apresentaram um declínio no sétimo dia pós-vacina, seguido de um aumento de frequência a partir do dia 14 após a vacinação, atingindo ápice no dia 28 (83). Tais resultados sugerem que alguns marcadores celulares na periferia também podem indicar a ativação de centros germinativos, como no caso do CXCL13, ligante do CXCR5, o qual foi recentemente descrito como marcador plasmático para ativação de centros germinativos (179). Os dados de sangue periférico após a vacinação com 17D podem estar relacionados com a migração dessas células para órgãos linfoides secundários logo no início da resposta contra o YFV e posterior saída desses tecidos de volta à periferia, denotando a cinética de desenvolvimento da resposta adaptativa contra o vírus. Com base nos dados da literatura e nos resultados obtidos neste estudo, é possível supor que as células depletadas na polpa branca do baço podem estar migrando para a periferia, bem como para outros tecidos, porém em desbalanço com a resposta que seria considerada fisiologicamente normal.

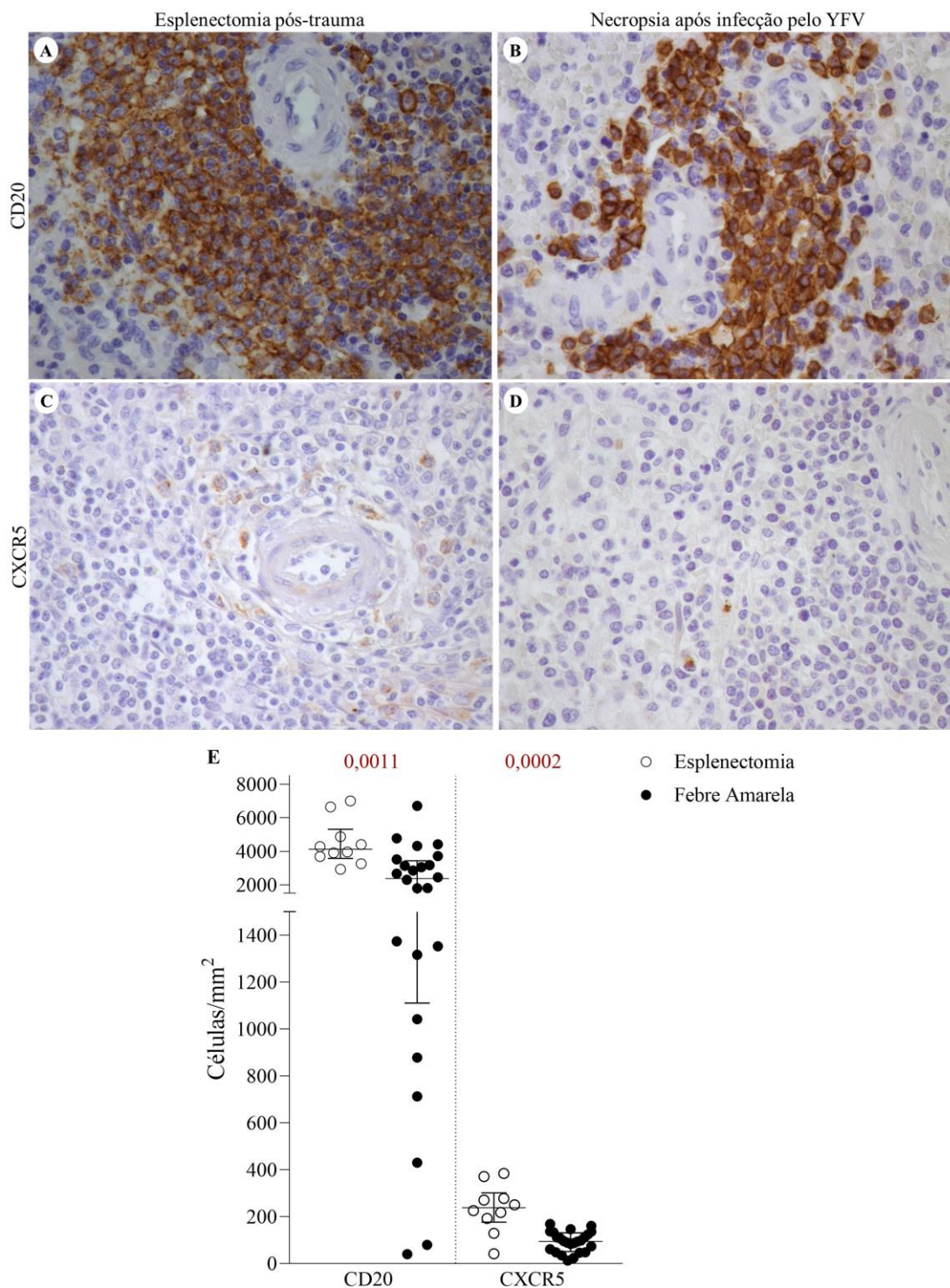


Figura 18. Imunomarcção para CD20 e CXCR5.

NOTA: **A.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-CD20. **B.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-CD20. **C.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-CXCR5. **D.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-CXCR5. Cortes 4 μ m. Coloração: Hematoxilina de Carazzi. Aumento de 400X. **E.** Avaliação quantitativa de células CD20⁺ e CXCR5⁺ nos grupos esplenectomia (controle) e febre amarela utilizando teste de Mann-Whitney. No gráfico são representadas as medianas para cada marcador e grupo com o intervalo interquartil.

Os marcadores Bcl6, CD10 e CD23 correspondem a proteínas relacionadas à formação de centro germinativos ou com o desenvolvimento da resposta ativa de linfócitos B no baço. Enquanto as células expressando Bcl6 se encontram com contagem ligeiramente aumentada no grupo febre amarela ($p = 0,0379$) (Figura 19A-B e G), as células expressando CD10 e CD23 se mostraram significativamente depletadas no grupo febre amarela ($p < 0,0001$ e $p = 0,0310$, respectivamente) (Figura 19C-G). A proteína Bcl6 é expressa em todos os linfócitos B do centro germinativo e também por alguns linfócitos T CD4⁺ dentro do centro germinativo e na região de PALS (118), porém não é expressa por células secretoras de anticorpos (180). A expressão de Bcl6 é capaz de prevenir apoptose, através do bloqueio da expressão de p53 (181), por isso, a expressão do fator de transcrição Bcl6 fora das condições de necessidade é um fator de risco para o desenvolvimento de linfomas (182).

A expressão de Bcl6 é essencial para proliferação e sobrevivência de células B do centro germinativo (118) e tem papel importante na etapa de rearranjos VJ das cadeias leves, sendo crucial para a construção do repertório de anticorpos (183). Foi constatado que na ausência da expressão dessa molécula ocorre a má-formação de centros germinativos, já que a mesma é necessária para a manutenção dessa estrutura (184), e a baixa expressão de Bcl6 pelos linfócitos B os mantém no estágio prévio à formação de centros germinativos, enquanto que o aumento da expressão de Bcl6 não interfere nesse processo, gerando uma resposta de magnitude esperada (185). Por esta razão, o Bcl6 passou a ser utilizado como um marcador de identificação de centros germinativos, caracterizando o papel e a localização dos linfócitos B expressando Bcl6, os quais se localizam primariamente nas bordas dos folículos para posteriormente se concentrarem, em sua maioria, dentro dos centros germinativos (186).

Um estudo de amostras de baço de indivíduos que foram a óbito durante a fase aguda da infecção pelo SARS-CoV-2 apresentou a diminuição da formação de centros germinativos pela ausência de linfócitos B Bcl6⁺, porém com expressão de AID preservada e, em conjunto com dados de frequência de plasmoblastos aumentada no sangue periférico, indicam que a maioria desses plasmoblastos foi gerada de forma extrafolicular (187). Neste trabalho, os indivíduos do grupo de febre amarela apresentaram um aumento de células expressando Bcl6 quando comparado ao grupo esplenectomia. De fato, é esperado que ocorra um aumento do número dos centros germinativos durante uma infecção, principalmente durante a fase aguda da doença. Entretanto, vale ressaltar que metade dos indivíduos avaliados neste estudo apresentou

contagem de células expressando Bcl6 próxima àquela encontrada nos indivíduos do grupo esplenectomia, sugerindo que existe uma deficiência na resposta desses indivíduos infectados pelo YFV. Estes achados, em conjunto com nossos dados previamente apresentados sobre a expansão de ASC (plasmoblastos e plasmócitos) no sangue periférico, indicam também que, assim como estudos em COVID-19, a resposta apresentada por esses indivíduos é gerada em sua maioria de forma extrafolicular. A resposta T independente é caracterizada por ser extrafolicular e ter duração inferior à resposta gerada através de centros germinativos, que pode persistir por semanas (76). Linfócitos B com características de centros germinativos, porém, identificados exercendo resposta T independente, apresentam alta expressão de Bcl6; contudo, essas células surgem logo no início da infecção e não são duradouras (73), sugerindo que essa resposta pode até ser eficiente no início de uma infecção, com o objetivo de se gerar uma resposta mais rápida, porém para que a infecção seja devidamente controlada faz-se necessário que a resposta humoral também seja estabelecida de maneira T dependente, o que acontece mediante a formação dos centros germinativos.

O marcador CD10, característico de linfócitos B localizados nos centros germinativos (188) é também comumente utilizado para detecção de linfomas, por ser diferencialmente expresso em linfócitos neoplásicos, mas também pode ser encontrado em neutrófilos localizados nas regiões externas aos folículos do tecido linfoide, que, ocasionalmente, se aproximam dos folículos (189), e em células T auxiliares dentro dos centros germinativos (190). As células B CD10⁺ são encontradas apenas enquanto estão reativas dentro dos centros germinativos, ao passo que, assim que deixam essa região, perdem a expressão desse marcador ao se diferenciarem em células B de memória ou plasmócitos (119). A quantificação de células CD10⁺ na região de polpa branca indica a presença de linfócitos B maduros e reativos, e, por isso, a diminuição dessas células no grupo que foi a óbito após infecção pelo YFV pode indicar que houve uma intensa migração desses linfócitos para a circulação como também a presença de uma resposta imune deficiente nestes indivíduos, principalmente quando a diminuição de células CD10⁺ estiver associada à redução na contagem de células expressando Bcl6, como parece acontecer em alguns indivíduos do grupo febre amarela.

Células B foliculares são conhecidas por expressar CD23, um marcador de células B maduras (120), as quais participam majoritariamente da resposta T dependente (191). O marcador CD23 foi inicialmente descrito como receptor de Fc para IgE, porém ele também possui importante papel na resposta IgG, regulando a diferenciação em células

plasmáticas produtoras dessa imunoglobulina (82). Quando as células B foliculares entram em contato com células T auxiliares é possível que haja a formação de centros germinativos ou o desenvolvimento em plasmoblastos, células de vida curta, porém grande produtoras de anticorpos (192). Sendo assim, podemos considerar que as células foliculares presentes na polpa branca do baço têm um papel crucial na produção rápida de anticorpos e na mediação de uma resposta mais duradoura realizada através de centros germinativos. Neste estudo, a contagem aumentada de células expressando Bcl6 e CD10 e a depleção de células expressando CD23 pode indicar a possibilidade de uma resposta desbalanceada acontecendo de forma descoordenada nos indivíduos infectados pelo YFV, pois apesar de se observar a formação de centros germinativos, a depleção de diversas células essenciais para a formação da resposta humoral de ação duradoura e manutenção dessas estruturas sugerem um impacto negativo na formação da resposta eficaz contra o YFV.

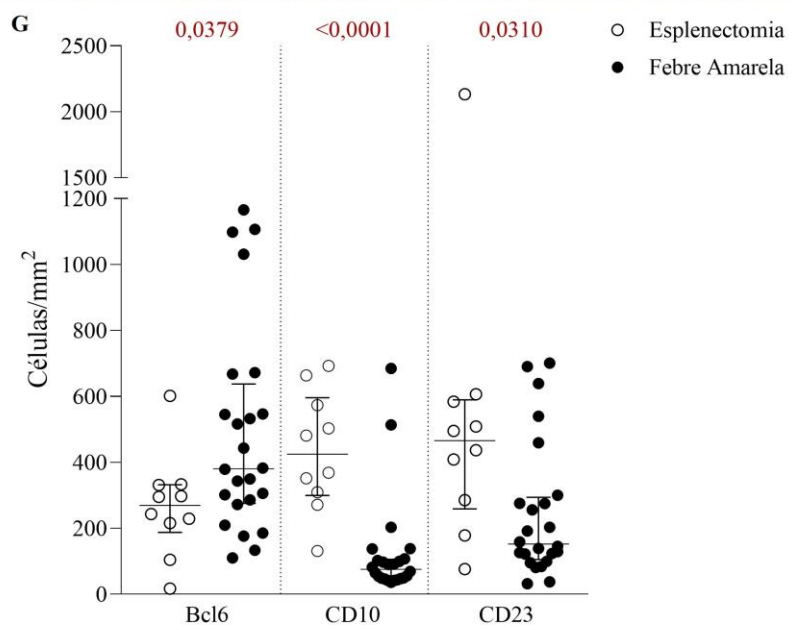
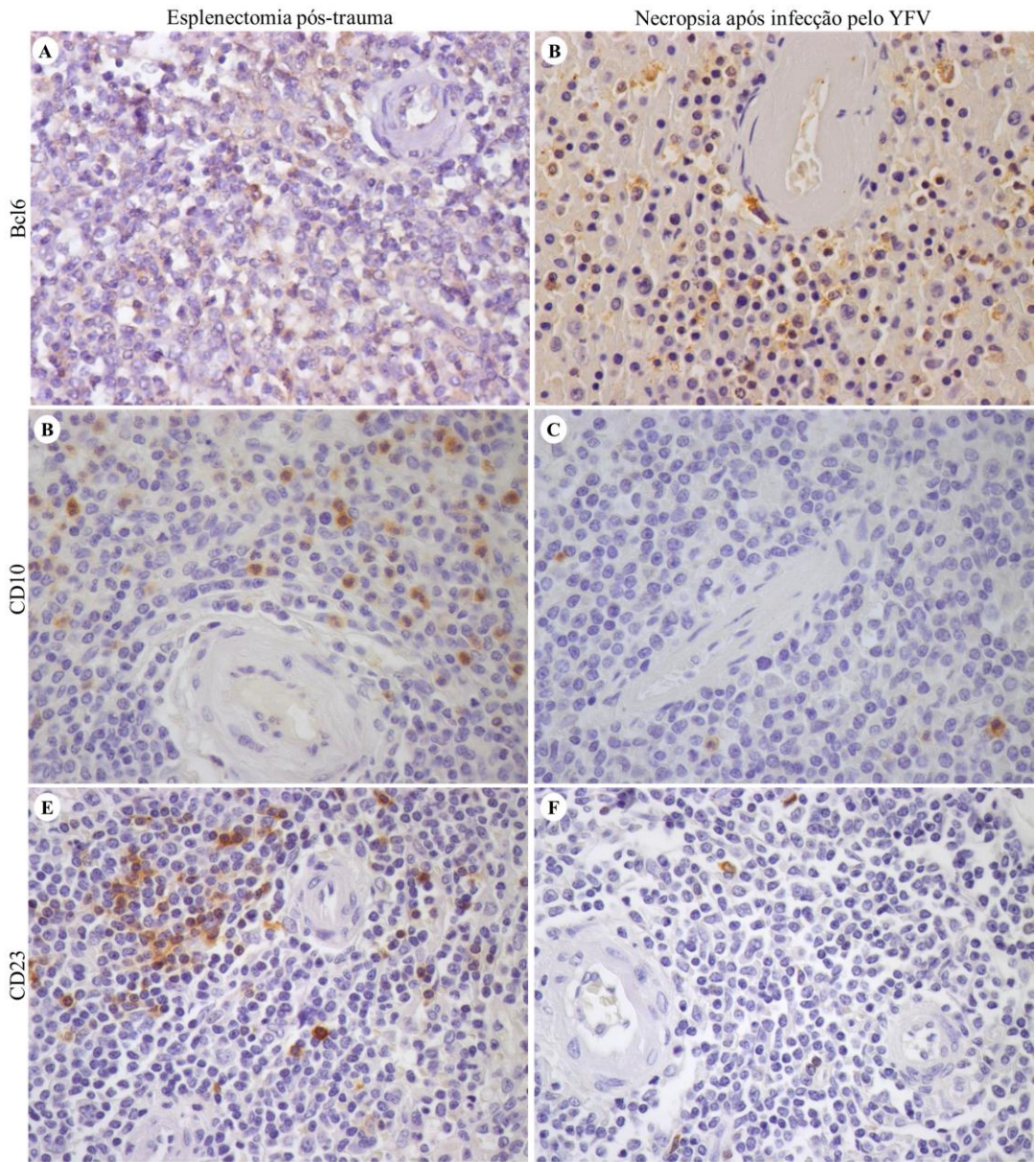


Figura 19. Imunomarcção para Bcl6, CD10 e CD23.

NOTA: **A.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-Bcl6. **B.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-Bcl6. **C.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-CD10. **D.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-CD10. **E.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-CD23. **F.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-CD23. Cortes 4 µm. Coloração: Hematoxilina de Carazzi. Aumento de 400X. **G.** Avaliação quantitativa de células Bcl6⁺ CD10⁺ CD23⁺ nos grupos esplenectomia (controle) e febre amarela utilizando teste de Mann-Whitney. No gráfico são representadas as medianas para cada marcador e grupo com o intervalo interquartil.

Os últimos marcadores analisados foram CD138, CXCR4 e IgG, e os três têm relação direta com a diferenciação final dos linfócitos B em plasmoblastos e plasmócitos (76,104), com a habilidade de migração dessas células (79) e com a produção de anticorpos, respectivamente. Ao passo que há uma diminuição das células expressando CD138 na região da polpa branca quantificada nos indivíduos do grupo febre amarela (Figura 20A-B e G) ($p = 0,0001$), existe um aumento significativo das células expressando tanto CXCR4 quanto IgG nesta mesma região (Figura 20C-G) ($p = 0,0005$ e $p = 0,0418$, respectivamente).

O marcador CD138, também conhecido como sindecano-1, é expresso em células plasmáticas em condições normais e tem papel importante na interação entre células e das células com a matriz extracelular (76,193). Uma parcela de plasmoblastos também expressa CD138 na circulação (194), porém em menor intensidade (195). Plasmoblastos e plasmócitos possuem tempo de vida muitos distintos; enquanto plasmoblastos possuem vida curta de 3 a 5 dias, podendo também ser conhecidos como plasmócitos de vida curta, os plasmócitos, por serem células não proliferativas, têm tempo de vida que pode durar de meses até a vida toda do indivíduo (79), porém o caminho de diferenciação desses dois tipos celulares ainda é incerto.

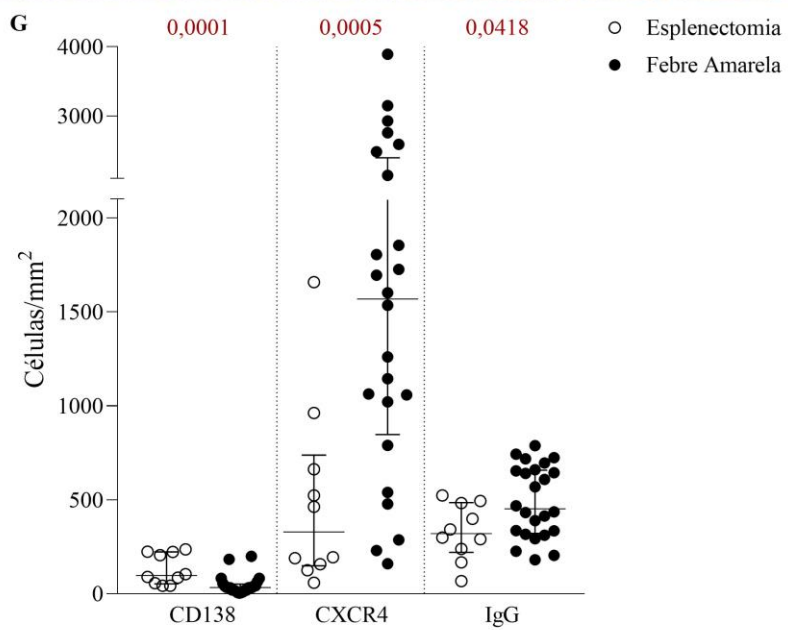
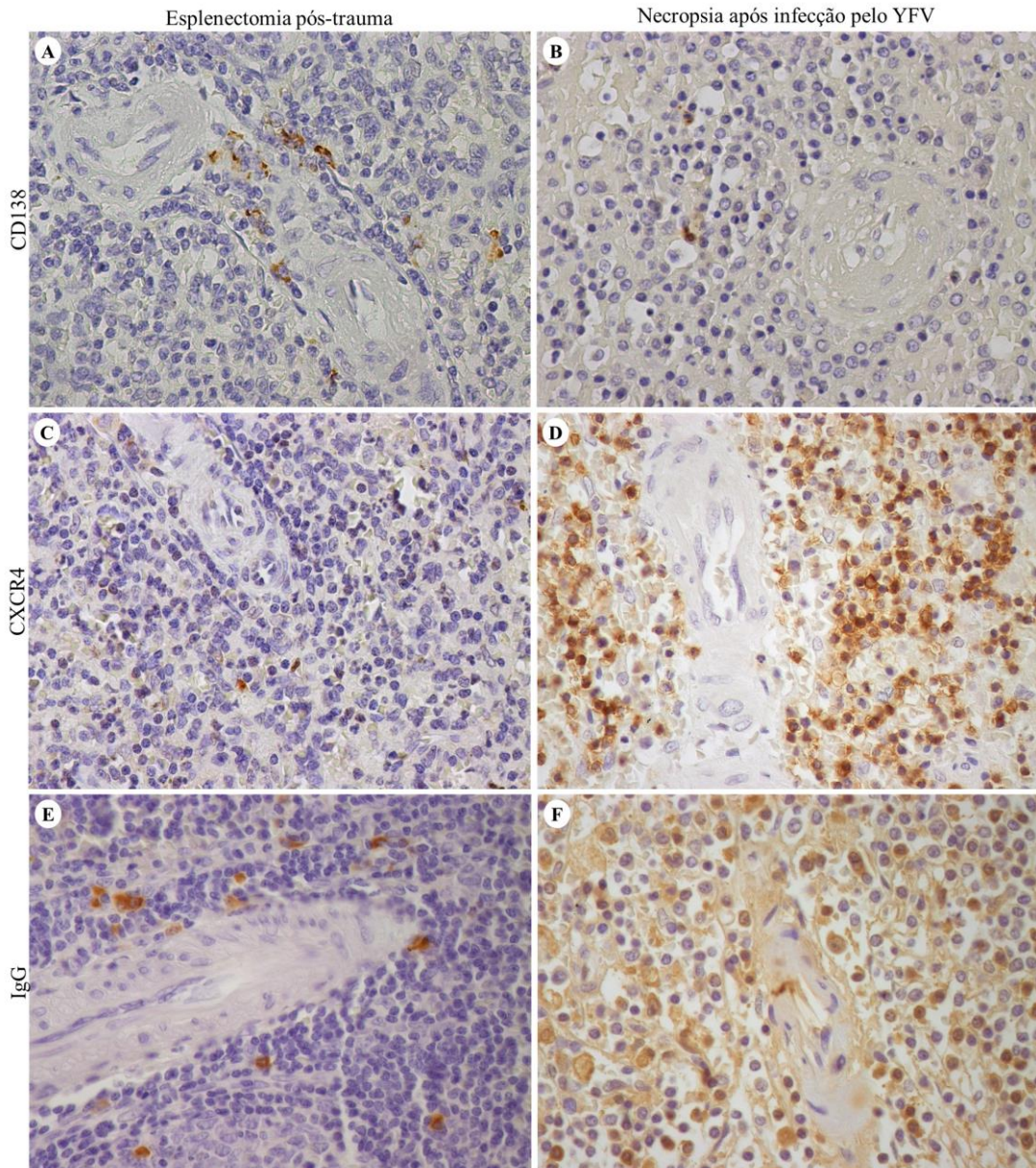


Figura 20. Imunomarcção para CD138, CXCR4 e IgG.

NOTA: **A.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-CD138. **B.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-CD138. **C.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-CXCR4. **D.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-CXCR4. **E.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo febre amarela imunomarcado com anticorpo anti-IgG. **F.** Região adjacente à arteríola central da polpa branca de um fragmento de baço do grupo controle imunomarcado com anticorpo anti-IgG. Cortes 4 μm . Coloração: Hematoxilina de Carazzi. Aumento de 400X. **G.** Avaliação quantitativa de células CD138⁺ CXCR4⁺ IgG⁺ nos grupos esplenectomia (controle) e febre amarela utilizando teste de Mann-Whitney. No gráfico são representadas as medianas para cada marcador e grupo com o intervalo interquartil.

Apesar de pouco se saber sobre o desenvolvimento das ASC, sabe-se que a maioria dos plasmoblastos é gerada pela via T independente, extrafolicular, e plasmócitos pela via T dependente, através de centros germinativos (76). Nesse sentido, para entender qual o tipo celular presente na polpa branca expressando CD138 estava diminuído, foi realizada uma contagem diferencial com o auxílio do especialista patologista Dr. Amaro Nunes Duarte Neto, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que possibilitou identificar quais células do tecido expressando CD138 eram plasmoblastos e quais eram plasmócitos tanto na polpa branca, quanto na polpa vermelha. Essa diferenciação é feita por meio do formato da célula e do aspecto do núcleo e do citoplasma. Plasmoblastos são células aumentadas pelo seu estado altamente proliferativo, apresentando razão entre tamanho de núcleo e citoplasma alta e nucléolos proeminentes em um núcleo excêntrico. Plasmócitos são células também aumentadas, em formato ovalado, possuindo núcleo com aspecto de “relógio” e cromatina bruta, no citoplasma se destaca uma área clareada, que corresponde a grande quantidade de complexos de golgi (194,196) (Figura 21).

A comparação dos resultados obtidos na contagem diferencial entre os grupos febre amarela e esplenectomia mostrou que é a população de plasmócitos que levou à diminuição de células expressando CD138 na polpa branca ($p = 0,0092$) (Figura 21A-B e G), visto que não houve diferença na contagem de plasmoblastos nesta mesma região ($p = 0,04488$) (Figura 21). Em contrapartida, na região da polpa vermelha foi possível identificar aumento significativo de plasmoblastos ($p = 0,0001$), enquanto os plasmócitos também se encontravam diminuídos quando comparado ao grupo esplenectomia ($p = 0,0003$) (Figura 21). Para entender melhor o perfil dessas células secretoras de anticorpos entre polpa branca e polpa vermelha, a comparação dessas células entre regiões também foi realizada, porém a única diferença encontrada foi na

contagem de plasmoblastos no grupo febre amarela, os quais estavam aumentados na polpa vermelha quando comparados com a polpa branca ($p = 0,0003$). Esse aumento de plasmoblastos na polpa vermelha pode ser interpretado como a fase inicial de um efluxo dessas células, geradas de forma T independente, em direção à circulação e outros órgãos, fato esse que corrobora com o aumento da frequência de ASC no sangue periférico detectado nos casos de febre amarela que foram a óbito, incluindo os indivíduos avaliados neste estudo, cuja expansão pode ser observada no quarto dia após o início de sintomas, atingindo ápice no sexto dia e se mantendo em frequências aumentadas até o décimo quarto dia (Figura 5). Com relação à diminuição de plasmócitos, tanto na polpa branca quanto na polpa vermelha, pode-se presumir que, dado o pouco tempo de infecção, essas células ainda se encontravam em processo de formação nos centros germinativos ou já se encontravam em circulação, no caso de uma resposta desbalanceada e prematura, também evidenciada na frequência aumentada dessas células no sangue periférico logo no décimo dia após início de sintomas nestes e em outros indivíduos da coorte de infectados pelo YFV que foram a óbito. Em um estudo com uma coorte de indivíduos com infecção aguda pelo vírus da hepatite A foi observado que a maior parte das ASC circulantes eram plasmoblastos específicos para o vírus, em sua maioria secretando anticorpos do tipo IgM, ao passo que os plasmócitos identificados com alta expressão de CD138 não eram, em sua maioria, específicos para o vírus e possuíam características de plasmócitos derivados da medula óssea, sugerindo que essas células foram reconvocadas de nichos da medula óssea e baço, enquanto plasmoblastos foram gerados a partir de células B imaturas, provavelmente de forma T independente (197), padrão também identificado para infecção aguda pelo rotavírus (198), fato esse que pode também ter ocorrido nos indivíduos da coorte infectada com YFV apresentada em nosso estudo.

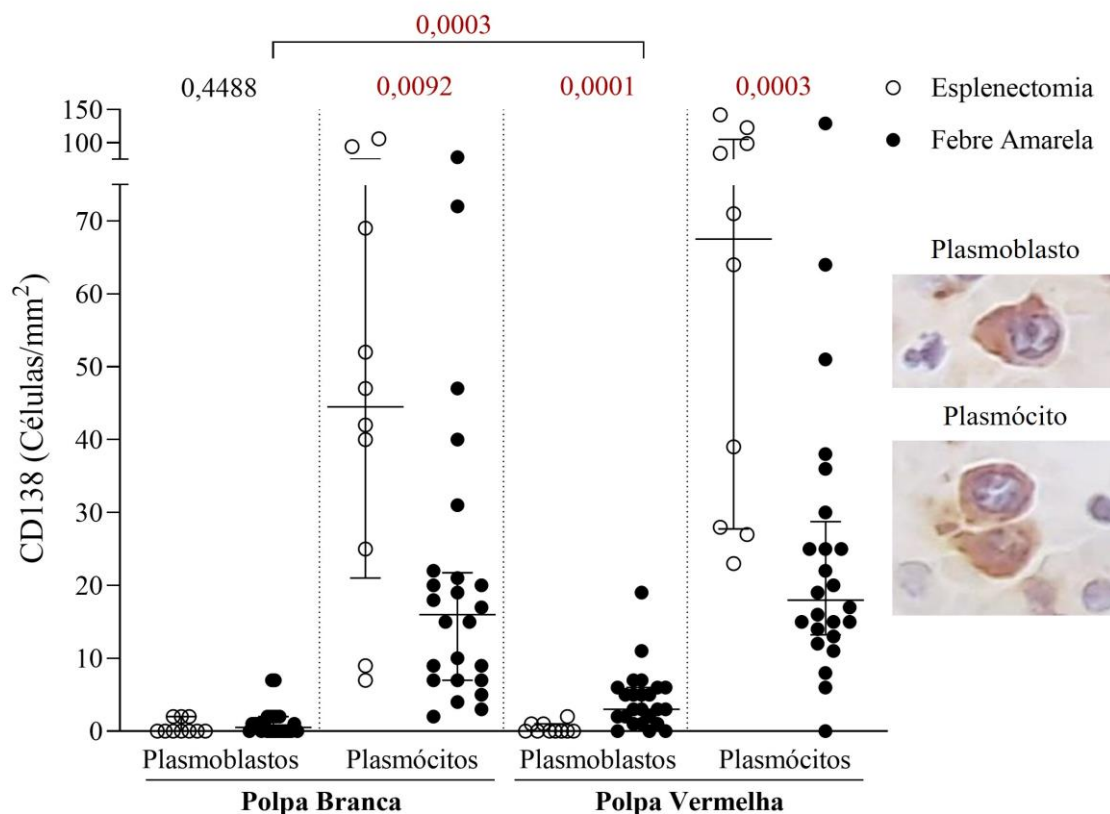


Figura 21. Distribuição de células CD138⁺ na polpa branca e polpa vermelha.

NOTA: Avaliação quantitativa de células CD138⁺ nos grupos esplenectomia (controle) e febre amarela nas regiões da polpa branca e polpa vermelha utilizando teste de Mann-Whitney. No gráfico são representadas as medianas para cada marcador e grupo com o intervalo interquartil. Ao lado, um exemplo de plasmoblasto e plasmócito na polpa branca, aqui representadas com o marcador CD39⁺ por questões de melhor visualização.

Interessantemente, o marcador CD138 é também considerado um marcador de retorno das células B para a medula óssea (79,197). Complementarmente à expressão do marcador CXCR4, a expressão do CD138 está altamente relacionada com a migração dessas células para a polpa vermelha, a saída do baço e a ida até seu futuro nicho, a medula óssea, onde serão mantidas e reconvocadas em caso de nova exposição ao antígeno (79,199). A expressão de CXCL12 por células estromais na região da polpa vermelha proporciona a migração de plasmoblastos e plasmócitos para essa região, por ser um ligante do receptor CXCR4 expresso nessas populações celulares, possuindo também, papel na manutenção da diferenciação em plasmócitos, o direcionamento para a medula óssea e a sobrevivência de plasmócitos (76,79,200,201). Assim como a expressão do marcador CD138, a expressão do marcador CXCR4 está presente em plasmoblastos, porém é muito mais característica em plasmócitos (76), sendo presente em cerca de um terço de células plasmáticas de órgãos linfoides secundários, como o baço (195). Os plasmócitos do baço deixam de expressar CXCR5 e CCR7 e passam a

expressar CXCR4 até a sua chegada à medula óssea, quando então a expressão de CXCR4 diminui, sendo a localização condizente com a formação de uma resposta protetora no caso de um novo encontro com o antígeno (200). As observações feitas neste trabalho também apontam para esse fenômeno, visto que foi detectada a diminuição de células expressando CXCR5 (Figura 18C-D e E) e o aumento de células expressando CXCR4 (Figura 20C-D e G) na região de polpa branca indicando a provável fase de resposta em que esses indivíduos se encontravam pouco antes de irem à óbito. É possível supor que enquanto ocorria a formação intensa de plasmoblastos a partir de células imaturas e de forma T independente e extra folicular na região da polpa branca, plasmócitos eram recrutados de nichos da medula óssea, por exemplo, para a circulação para então migrar de volta a esses nichos, ocasionando o grande influxo dessas células prematuramente na circulação, aparentemente com pouca eficácia para conter a infecção. Esse fenômeno também se assemelha ao que foi observado previamente em casos de infecção aguda pelo vírus da hepatite A (197) e casos graves de infecção pelo SARS-CoV-2 (187).

O visível aumento da expressão de IgG já nas fotomicrografias (Figura 20E-F), concordante com a estatística encontrada (Figura 20G), mostra a produção exacerbada dessa imunoglobulina na região da polpa branca nos indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV. Apesar da grande presença de IgG na polpa branca, a quantificação de IgG no sangue periférico não foi realizada e, apesar da altíssima frequência de plasmoblastos na circulação, é provável que grande parte dessas células fosse produtora de IgM e não IgG, como nos casos de hepatite A (197), visto o aumento precoce dessas células já no quarto dia após o início dos sintomas (Figura 5), não havendo tempo hábil para troca de isotipo ou SHM, etapas que acontecem em sua maioria dentro de centros germinativos, em uma resposta mais demorada e duradoura (77,202). Estudos ainda sugerem que a deficiência de Bcl6 prejudica a produção de anticorpos específicos gerados por linfócitos B vindos de respostas T dependente (92) e, visto que nos indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV não ocorreu o esperado aumento da expressão de Bcl6 na polpa branca, indicativo do aumento da formação de centros germinativos, há a possibilidade de que o aumento de IgG possa ser oriundo de células que não passaram pelo processo de maturação de afinidade, de plasmócitos recrutados de nichos da medula óssea, ou ainda de plasmoblastos gerados de forma extrafolicular em uma tentativa de eliminação viral.

4.4.4. Análise integrada dos dados

Para a melhor visualização dos dados como um todo, foi realizada a análise integrada por meio de uma matriz de correlação, também chamada de correlograma, a qual foi gerada utilizando o programa R implementado no software RStudio. Nele foram reunidos os dados de exames clínicos e laboratoriais obtidos no dia da admissão dos pacientes no hospital; os resultados da imunofenotipagem de superfície de sangue total por citometria de fluxo para detecção da cinética de ASC, considerando-se os valores de frequência obtidos no ápice de expansão celular de cada indivíduo; e os dados gerados das análises de imuno-histoquímica. Para a construção dos correlogramas foi necessário separar o grupo febre amarela (Figura 22) do grupo esplenectomia (Figura 23), para que fosse possível realizar as correlações dos dados dos mesmos indivíduos.

No correlograma do grupo febre amarela é possível identificar que não houve correlações referentes à idade dentro do grupo (Figura 22), sugerindo que esse parâmetro não teve impacto nos achados e demais correlações gerados neste estudo. Com relação aos dados sobre as ASC, tanto aquelas derivadas da periferia (ápice da frequência de ASC circulantes) e as ASC identificadas do baço, considerando tanto área da polpa branca quanto da polpa vermelha, foram detectadas correlações positivas, ou seja, quando uma das variáveis aumentava, a outra também apresentava aumento em uma razão proporcional, o que é esperado, visto que são as mesmas células, apenas em localizações distintas. Porém, a correlação positiva entre as células expressando CD138 na polpa branca e as células expressando IgG na mesma região ($r = 0,46$ e $p = 0,025$), ainda que esperada, é interessante, pois associa a produção de imunoglobulinas com o aumento dessas células.

Além disso, é válido ressaltar algumas correlações observadas com a citocina IL10, que apesar de não apresentar diferença entre os grupos febre amarela e esplenectomia, apresentou correlações positivas com as células expressando IgG na polpa branca ($r = 0,54$ e $p = 0,007$), e as células secretoras de anticorpos no sangue periférico ($r = 0,48$ e $p = 0,019$) no grupo febre amarela. Vale ressaltar que a IL10 está diretamente envolvida e tem um papel importante na produção de anticorpos, principalmente do isotipo IgG (172,203). Outras correlações positivas interessantes encontradas foram entre as células expressando IFN γ e CD68 ($r = 0,45$ e $p = 0,027$), citocina característica por estimular macrófagos (122,170); entre células expressando IL33 e Foxp3 ($r = 0,42$ e $p = 0,039$), citocina também característica por ativar células T

reguladoras (125,204) caracterizadas pela expressão de Foxp3 (68); algumas correlações entre o tempo para óbito e plasmócitos na polpa vermelha ($r = 0,61$ e $p = 0,002$) e plasmócitos no sangue periférico ($r = 0,44$ e $p = 0,031$) também foram observadas, as quais indicam que os indivíduos com tempo maior de sobrevivência apresentavam mais plasmócitos em saída do baço bem como maior frequência dessas células na periferia, indicando que os plasmócitos têm um aparecimento mais tardio durante a infecção nesses casos, o que é esperado, devido a via pela qual essas células são geradas.

Por fim, algumas correlações negativas, ou seja, correlações inversas, nas quais a medida que uma variável aumenta, a outra diminui em uma razão proporcional, foram identificadas: entre células expressando CD23 e CD20 ($r = -0,54$ e $p = 0,006$), podendo ser visto como o aumento da formação de células B ativadas (CD23⁺) em estágio mais avançado da maturação, previamente identificadas no baço (205), embora em menor quantidade, já que foi também destacada a depleção de ambos os marcadores quando em comparação com o grupo esplenectomia; e entre células expressando CXCR5 e Bcl6 ($r = -0,49$ e $p = 0,014$), correlação interessante pois pode indicar o desbalanço da resposta imune já que a expressão de Bcl6 induz a diferenciação de células T auxiliares foliculares (CXCR5⁺) em células efectoras de memória, além de auxiliar na produção de anticorpos elaborados de forma T dependente (206). Algumas correlações interessantes também foram observadas entre o tempo para óbito e outros marcadores, incluindo o Bcl6 ($r = -0,43$ e $p = 0,037$), que pode sugerir que os indivíduos com tempo de sobrevivência maior foram os que apresentaram maior contagem de células expressando Bcl6, marcador específico envolvidos na formação de centros germinativos (118); o CXCR4 ($r = -0,45$ e $p = 0,028$), exemplificando que o maior tempo para óbito aumenta a contagem de células com características migratórias, especialmente plasmócitos (79); e a viremia ($r = -0,42$ e $p = 0,042$), considerando o ponto de ápice detectado para cada indivíduo, dado que corrobora com o resultado previamente publicado por nosso grupo, mostrando o seu decaimento com o passar dos dias após a infecção (11).

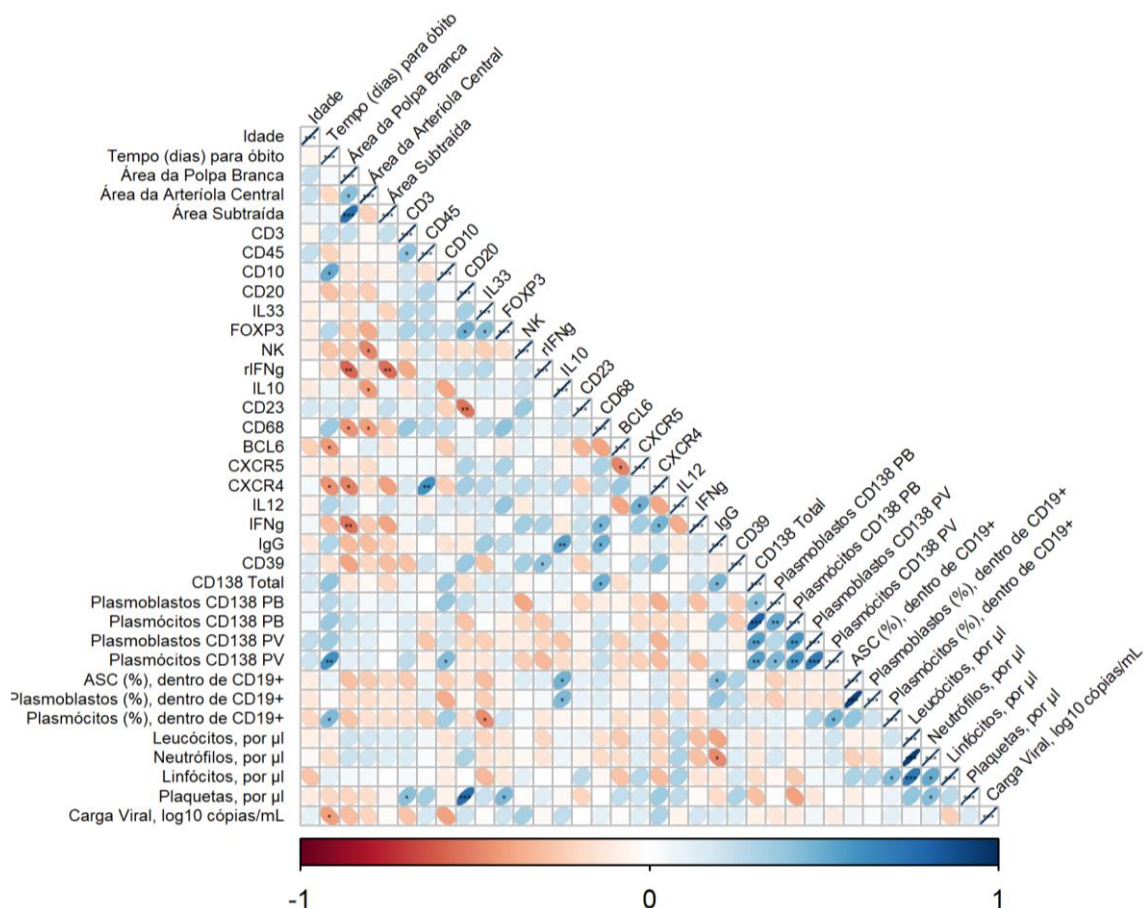


Figura 22. Correlograma dos dados clínicos, de citometria do sangue periférico e imunohistoquímica do baço dos indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV (n = 24).

NOTA: Matriz de correlação realizada com o auxílio do programa R implementado no software RStudio e o pacote “corrplot” no qual foi possível realizar a correlação de diversas variáveis dentro do grupo de indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV. PB – Polpa Branca; PV – Polpa Vermelha.

A realização da matriz de correlação para o grupo esplenectomia auxilia a entender correlações esperadas em indivíduos não infectados, e que não foram identificadas nos indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV. Primeiro, algumas correlações negativas encontradas foram interessantes, como a correlação entre CD20 e a idade dos indivíduos ($r = -0,67$ e $p = 0,033$), mostrando que as células expressando CD20 no baço diminuem com a idade, corroborando com alguns estudos prévios, que indicam a diminuição progressiva de células B $CD20^+$ no baço (100). Outro exemplo é a correlação negativa entre células expressando CD138, presentes na região da polpa branca e, a contagem de células expressando CXCR4 na mesma região ($r = -0,78$ e $p = 0,008$), mostrando que as ASC detectadas no baço desses não apresentam perfil migratório, o que pode estar relacionado ao fato de que esses indivíduos não apresentavam um quadro infeccioso. Outras duas correlações positivas esperadas para indivíduos saudáveis foram encontradas, não sendo observadas nos

indivíduos do grupo febre amarela: a correlação entre células expressando IgG e Bcl6 ($r = 0,65$ e $p = 0,043$), que indica o aumento da produção de anticorpos diretamente correlacionado com o aumento da geração de centros germinativos, uma condição fisiológica (79); e a correlação entre plasmoblastos presentes na região da polpa vermelha e células expressando IgG ($r = 0,76$ e $p = 0,010$), que corrobora com a correlação anterior, relacionado a um contexto fisiológico esperado.

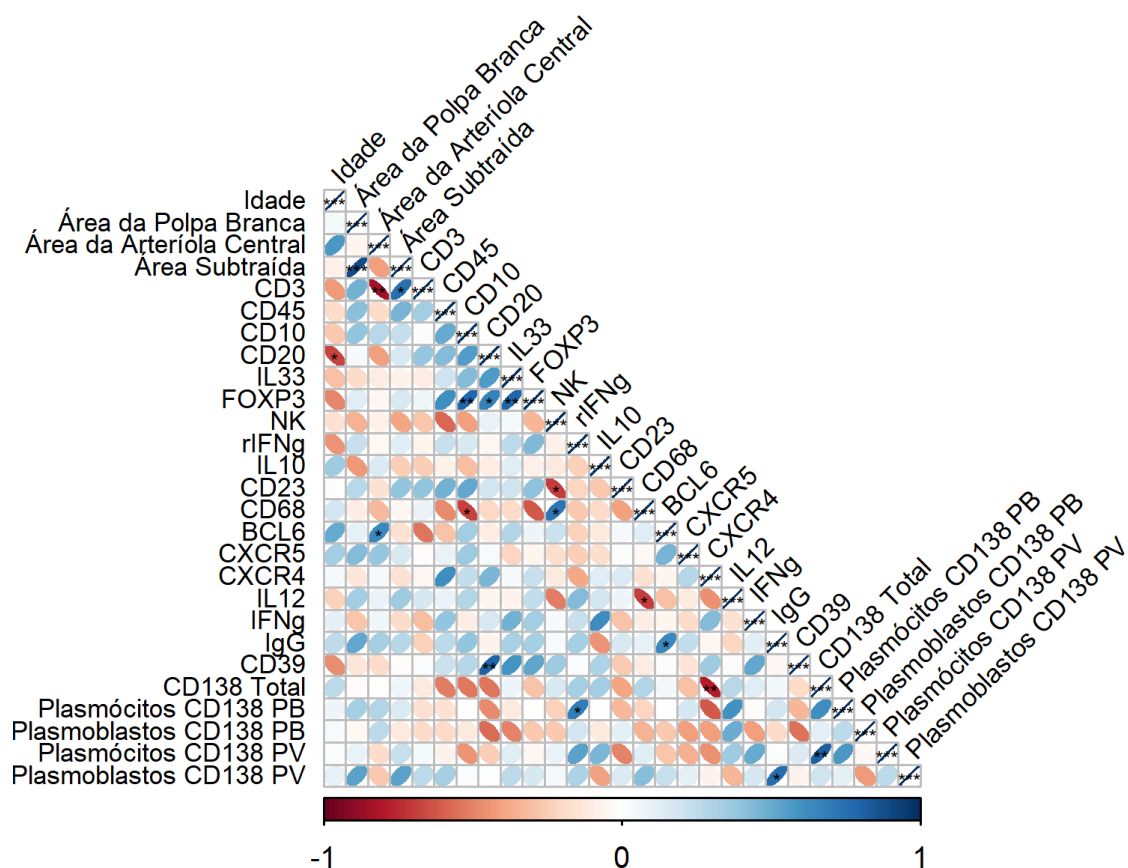


Figura 23. Correlograma dos dados de imuno-histoquímica do baço dos indivíduos que passaram por esplenectomia pós-trauma (n = 10).

NOTA: Matriz de correlação realizada com o auxílio do programa R implementado no software RStudio e o pacote “corrplot” no qual foi possível realizar a correlação de diversas variáveis dentro do grupo de indivíduos passaram por esplenectomia pós-trauma. PB – Polpa Branca; PV – Polpa Vermelha.

A partir dos dados apresentados neste trabalho e dados da literatura, especialmente envolvendo indivíduos infectados durante o surto de febre amarela que acometeu a região sudeste, mais significativamente no ano de 2018, foram feitas algumas associações e conclusões.

Durante uma infecção, mais especificamente durante a fase aguda, algumas reações referentes ao sistema imune são esperadas. No baço, por exemplo, a proliferação celular na região da polpa branca é uma das reações esperada, visto que as

células imaturas são ativadas e se proliferam para que células especializadas fiquem disponíveis na periferia e em outros órgãos, os quais podem ser mais acometidos que outros devido ao tropismo do patógeno causador da doença. A figura 24 representa um esquema do desenvolvimento esperado da resposta imune no baço, mais especificamente na região de polpa branca, indicando a ativação e proliferação de células e suas conseqüentes migrações para diversos órgãos, também considerando a circulação dessas células na periferia e também a migração para nichos de células especializadas, como a medula óssea, que abriga um importante nicho de células B de memória e plasmócitos, os quais já passaram pela troca de isotipo, SHM e aumento de especificidade e são responsáveis pela memória imunológica, caso ocorra um novo encontro com o patógeno.

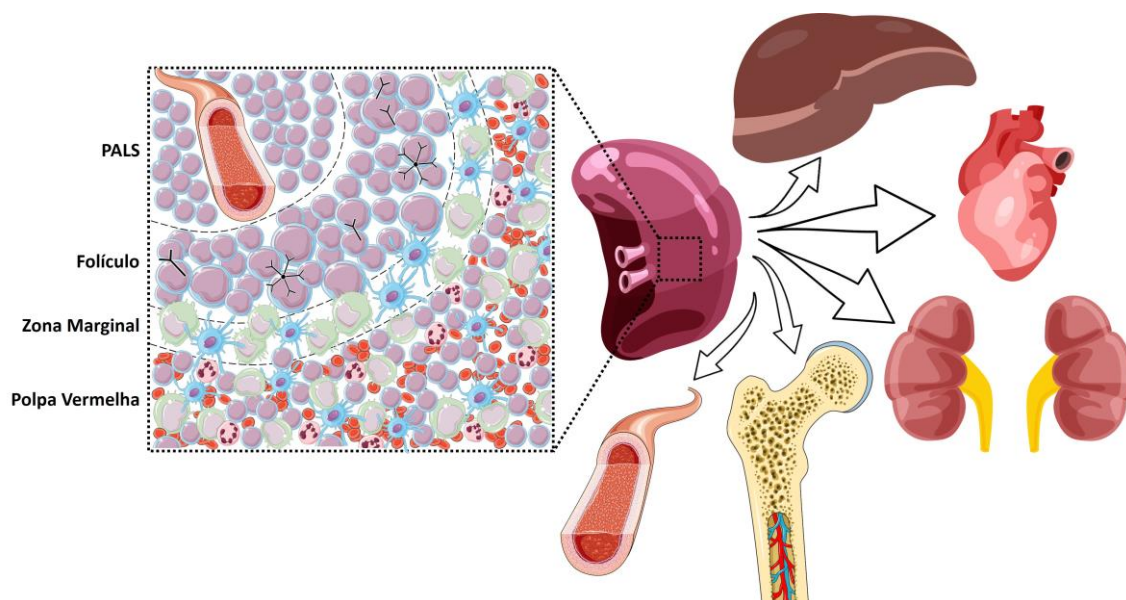


Figura 24. Representação esquemática da resposta imune esperada durante um processo infeccioso. NOTA: Representação esquemática de uma microscopia de baço, contemplando polpa branca e polpa vermelha, como também regiões como a zona marginal, os folículos e a bainha periarteriolar de linfócitos (PALS, ou zona de células T). De baixo para cima o exemplo de migração das células da resposta imune: para a periferia, com o recorte esquemático de uma artéria, recorte do osso femoral representando a medula óssea, rins, coração e fígado.

Neste trabalho, os indivíduos do grupo febre amarela, os quais possuem mediana de dias entre início de sintomas e óbito de 11 dias, caracterizando assim a o óbito durante a fase aguda da doença, apresentaram aspectos relevantes da imunidade, e em conjunto com dados da literatura a figura 25 foi elaborada. Neste trabalho foi evidenciada a depleção de células da resposta imune, deixando a região da polpa branca desorganizada, também com presença de hemorragia significativa, já detectada no momento da realização da autópsia, dado mais bem explorado na seção 4.2.

Levando em consideração os dados obtidos neste trabalho, nossos dados prévios e dados da literatura, é possível observar que a maioria das células depletadas na região de polpa branca do baço, durante a infecção pelo YFV, já foram identificadas aumentadas em outras regiões, como por exemplo os macrófagos (CD68⁺) no fígado (162), coração (140) e rins (161) e também o aumento de células CD45⁺ no coração (140) e Foxp3⁺ e NK⁺ nos rins (161), caracterizando assim o influxo dessas células saindo do baço em direção para essas regiões, em uma tentativa de combate à infecção local, visto que, especialmente o fígado e os rins, são órgãos os quais o YFV possui tropismo (64).

Além dos marcadores celulares identificados como diminuídos neste trabalho, também foram avaliadas uma série de citocinas pró e anti-inflamatórias, as quais não apresentaram diferença entre o grupo febre amarela e o grupo esplenectomia, porém, é interessante destacar duas citocinas, IL10 e IFN γ , as quais foram observadas aumentadas em cortes de indivíduos infectados pelo YFV, tanto nos rins (161), quanto no coração (140), caracterizando um balanço de atividades pró e anti-inflamatórias nessas localizações (122,123).

Algumas correlações entre os dados prévios de ASCs na periferia durante o auge da resposta de cada indivíduo e os relatados na polpa branca e polpa vermelha *post mortem* para os mesmos indivíduos foram evidenciadas neste trabalho, destacando especialmente as correlações positivas entre o total de ASC na polpa branca e seus subtipos, plasmoblastos e plasmócitos, tanto na polpa branca quanto na polpa vermelha e também correlações interessantes referentes aos plasmócitos das duas regiões, os quais se correlacionam positivamente com os plasmoblastos tanto na polpa branca, quanto na polpa vermelha e também com a frequência de plasmócitos na periferia, no auge da resposta de cada indivíduo, sugerindo assim o efluxo dessas células de seus nichos, como por exemplo a medula óssea, para os órgãos linfoides secundários, como o baço e de volta à circulação para o combate à infecção. Essa hipótese sugere a diminuição da população de plasmócitos especialmente do nicho da medula óssea, visto que é uma das principais localizações dessas células, já previamente especializadas, as quais podem ser reconvocadas para uma nova rodada de especificação, por meio da hipermutação somática, a qual acontece nos centros germinativos, presentes, por exemplo, na região de polpa branca do baço. Apesar de não haver correlações entre as frequências identificadas no auge da resposta de ASC totais e plasmoblastos na periferia com essas duas populações celulares presentes na polpa branca e polpa vermelha, uma correlação

negativa entre a frequência do total de ASC ($r = -0,2085$ e $p = 0,0212$) e plasmoblastos ($r = -0,3216$ e $p = 0,0003$) ao longo do período da infecção nos indivíduos sobreviventes foi identificada em nosso estudo anterior, seguindo diversos pontos de coleta, o qual demonstra que apesar da continuidade da fase aguda da infecção, os plasmoblastos tendem a voltar a valores mais próximos ao basal, causando um retorno dos valores de ASC totais também, por serem o subtipo que está mais presente na população de ASC, ao contrário da população de plasmócitos ($r = 0,3174$ e $p = 0,0432$), a qual possui uma correlação positiva entre a frequência e o período de infecção nos indivíduos que foram a óbito, os quais também foram avaliados o baço, demonstrando que a frequência dessas células aumenta ao passar dos dias da infecção. Tais dados, em concordância com o dado de aumento de plasmócitos na polpa vermelha nos indivíduos que sobreviveram por mais tempo, também sugere esse recrutamento de plasmócitos dos nichos da medula óssea, porém, no caso desses indivíduos, que foram à óbito, sem sucesso em combater a infecção.

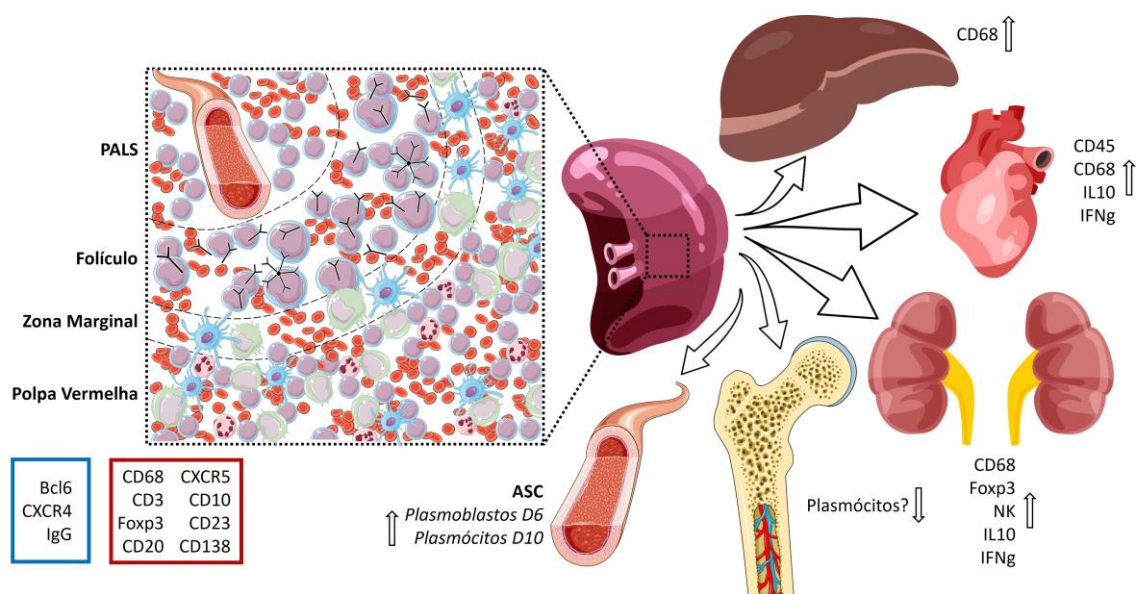


Figura 25. Representação esquemática da resposta imune desencadeada pelo YFV.

NOTA: Representação esquemática de uma microscopia de baço, contemplando polpa branca e polpa vermelha, como também regiões como a zona marginal, os folículos e a bainha periarteriolar de linfócitos (PALS, ou zona de células T) durante a fase aguda da infecção pelo YFV. De baixo para cima o exemplo de migração das células da resposta imune: para a periferia, com o recorte esquemático de uma artéria, recorte do osso femoral representando a medula óssea, rins, coração e fígado.

5. CONCLUSÕES

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que investiga e caracteriza a imunidade *in situ* do baço de indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV.

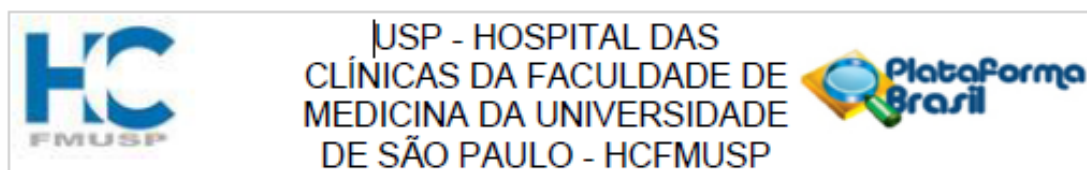
Nossos resultados mostram que entre os dois grupos analisados, febre amarela e esplenectomia pós-trauma, existe uma grande divergência na quantidade de células de populações envolvidas na resposta imune inata e adaptativa. Além da área de polpa branca adjacente à arteríola central estar diminuída no grupo febre amarela, a quantificação da maior parte dos subtipos celulares analisados nesta região se mostrou gravemente depletada (CD68, CD3, Foxp3, CD20, CXCR5, CD10, CD23 e CD138), enquanto alguns outros se mostraram aumentados, incluindo os marcadores Bcl6, CXCR4 e IgG. Esses dados sugerem o desenvolvimento de uma resposta imune desbalanceada e descoordenada, gerada de maneira prematura no baço de indivíduos que foram a óbito após a infecção pelo YFV. Por outro lado, também é interessante ressaltar que grande parte da depleção observada neste trabalho pode ter relação com a migração de células para órgãos os quais o YFV possui tropismo, como os rins e o fígado, na tentativa de combater a infecção.

A análise integrada dos dados reforça as conclusões geradas com base nos dados obtido pela análise de imuno-histoquímica nos fragmentos de tecido esplênico, revelando a existência de correlação entre os resultados da expressão de marcadores *in situ* e os dados prévios obtidos por nosso grupo, especialmente os dados de cinética de expansão de células secretoras de anticorpos em sangue periférico, indicando que, de fato, houve um descompasso na construção da resposta imune contra o vírus, o que impediu a formação de uma resposta eficaz, protetora e duradoura.

Os achados deste estudo poderão contribuir para um melhor entendimento sobre a imunopatogênese da febre amarela e representam os passos iniciais para a caracterização mais detalhada acerca do desenvolvimento da resposta imune em humanos no contexto da infecção natural pelo YFV, principalmente elucidando os eventos envolvidos no agravamento dessa doença.

6. ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ESPLÊNICO NA IMUNOPATÓGENESE DA FEBRE AMARELA

Pesquisador: Esper Georges Kallás

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41772720.5.0000.0068

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

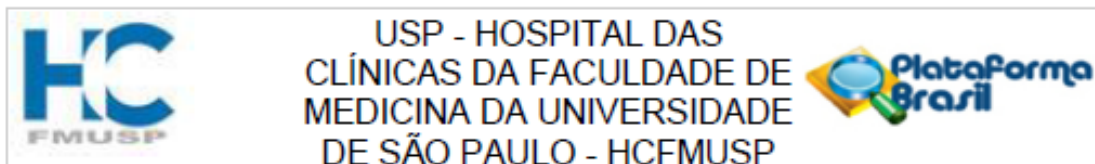
Número do Parecer: 4.590.740

Apresentação do Projeto:

A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa que ainda representa um problema de saúde pública no Brasil. Durante a epidemia de 2017-19 foram confirmados 1458 casos silvestres no país, com a taxa de letalidade atingindo 35%. A vacina contra o vírus da febre amarela (YFV) é altamente competente e confere imunidade protetora contra o vírus, porém a

cobertura vacinal no país ainda é insatisfatória e não há tratamento específico para a doença. Grande parte do conhecimento sobre o desenvolvimento da imunidade induzida pelo YFV é derivado de estudos realizados após a vacinação, principalmente devido à escassez de amostras humanas infectadas pelo YFV. Apesar da grande semelhança entre a resposta imune gerada pela vacinação e pela infecção natural, pouco ainda se sabe sobre o desenvolvimento da resposta celular e geração de memória humoral. Sendo o baço um órgão linfóide secundário de extrema importância para ocorrerem diversas interações celulares que permitem o desenvolvimento de uma resposta imune funcional contra o YFV, delimitar seu papel durante a imunopatogênese da febre amarela é essencial. Serão utilizadas amostras de baço de indivíduos que foram a óbito após a infecção natural pelo YFV selvagem (n=24) bem como informações clínicas e demográficas. As amostras serão processadas para microscopia de luz, tanto para avaliação histológica utilizando hematoxilina e eosina quanto para a técnica de imuno-histoquímica, a qual será realizada utilizando os marcadores BCL6, CD3, CD10, CD20, CD23,

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:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.590.740

CD45, CD68, CD138, CXCR4, CXCR5, FOXP3, IgG, IFNg, IL10, IL12, IL33, NK1 e rIFNg.

Objetivo da Pesquisa:

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é analisar, por imunohistoquímica, as modificações da imunidade tecidual do baço em indivíduos que foram a óbito após infecção pelo YFV selvagem, descrevendo as alterações histológicas e caracterizando a imunidade in situ.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de análise ao microscópio de amostras de tecido já processado segundo rotina de histopatologia e imunohistoquímica. Assim sendo, os riscos são mínimos. Não há benefícios diretos ao participante (trata-se de material obtido em autópsia), no entanto, do ponto de vista científico, esse estudo permitirá obter dados mais consistentes sobre o desenvolvimento da imunidade celular contra o YFV e aprimorar o conhecimento do papel do baço durante essa infecção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Solicita-se avaliação pela CAPPesq do projeto de pesquisa "Investigação do envolvimento do sistema esplênico na imunopatogênese da febre amarela" a ser desenvolvido pela pós-graduanda Mariana Prado Marmorato, sob orientação do Prof. Esper Kallas. O estudo irá utilizar parte de material coletado em autópsia para estudo anterior já aprovado, com anuência do pesquisador responsável e regulamento do biorepositório correspondente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores solicitam dispensa da obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido uma vez que será utilizado material já coletado em autópsia para estudo anterior, mais amplo e abrangente já aprovado pela CAPPesq (CAAE 88548318.7.0000.0068), para o qual foram coletados diversos órgãos por ocasião da epidemia de febre amarela em 2017-2018 no Estado de São Paulo. A presente investigação pretende detalhar e aprofundar análises específicas do baço. Os pesquisadores apresentam um Regulamento de Biorepositório adequado e justificativa para uso dessas amostras, sem necessidade de novas coletas. Além disso, há anuência do Pesquisador Responsável pelo estudo anterior para utilização do material.

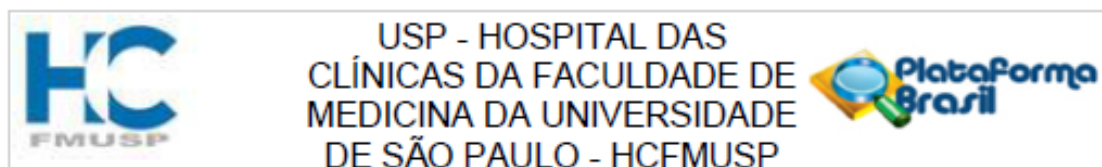
Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente protocolo apresenta todas as condições de ser aprovado para início imediato. Levando-

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: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.590.740

se em consideração a raridade do material a ser utilizado, adequadamente coletado à época da epidemia de febre amarela em 2017-2018, e a improbabilidade de causar malefícios, a Cappesq atende à solicitação dos pesquisadores para dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

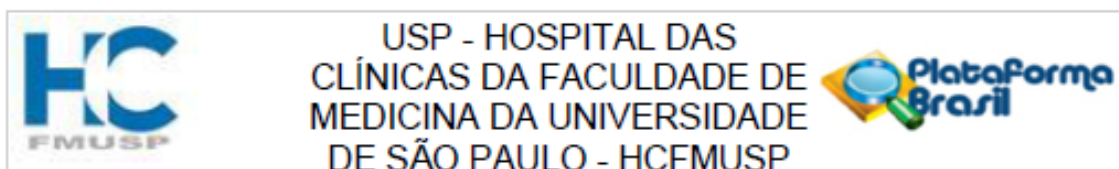
Considerações Finais a critério do CEP:

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_1670029.pdf	28/12/2020 11:16:41		Aceito
Outros	Cadastro_Online_MPM.pdf	28/12/2020 11:09:51	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Encaminhamento_Departamento_MPM.pdf	28/12/2020 11:08:51	Esper Georges Kallás	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_MPM.pdf	28/12/2020 11:04:23	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	CompromissoDoutorado_MPM.pdf	04/12/2020 09:12:06	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Parecer_Patologia_CEP_2669963.pdf	04/12/2020 09:05:35	Esper Georges Kallás	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_Uso_IMT.pdf	04/12/2020 09:03:46	Esper Georges Kallás	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura_MPM.pdf	04/12/2020 09:01:24	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	UsoDeDados_MPM.pdf	02/12/2020 10:45:14	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Anuencia_Uso_Amostras.pdf	02/12/2020 10:43:31	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	UtilizacaoAmostras_MPM.pdf	02/12/2020	Esper Georges	Aceito

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: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.590.740

Outros	UtilizacaoAmostras_MPM.pdf	10:35:45	Kallás	Aceito
Outros	Resumo_MPM.pdf	02/12/2020 10:33:40	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	AprovacaoPaisOrigem_MPM.pdf	02/12/2020 10:32:17	Esper Georges Kallás	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CompromissoAmostras_MPM.pdf	02/12/2020 10:30:38	Esper Georges Kallás	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CompromissoPesquisador_MPM.pdf	02/12/2020 10:29:49	Esper Georges Kallás	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio_MPM.pdf	02/12/2020 10:25:22	Esper Georges Kallás	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDoutorado_MarianaPMarmorato_CEP_2610.pdf	02/12/2020 10:23:45	Esper Georges Kallás	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCLE_MPM.pdf	02/12/2020 10:21:50	Esper Georges Kallás	Aceito
Orçamento	Orcamento_MPM.pdf	02/12/2020 10:20:56	Esper Georges Kallás	Aceito
Cronograma	Cronograma_MPM.pdf	02/12/2020 10:20:00	Esper Georges Kallás	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 15 de Março de 2021

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

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

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol*. 2015;
2. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular Biology of Flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:23–61.
3. Douam F, Ploss A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. Vol. 26, *Trends in Microbiology*. 2018.
4. Kean S. On the trail of yellow fever. Vol. 357, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2017. p. 637–41.
5. Vasconcelos PFC, Bryant JE, Travassos Da Rosa APA, Tesh RB, Rodrigues SG, Barrett ADT. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(9):1578–84.
6. Vasconcelos PF. [Yellow Fever]. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2003/06/10. 2003;36(2):275–93. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12806465>
7. Monath TP. Yellow fever: Victor, Victoria? Conqueror, conquest? *Epidemics and research in the last forty years and prospects for the future*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1991;45(1):1–43. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1867343>
8. Quaresma JA, Barros VL, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CF, 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* [Internet]. 2005/11/08. 2006;345(1):22–30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16278000>
9. Quaresma JA, Barros VL, Fernandes ER, Pagliari C, Guedes F, da Costa Vasconcelos PF, et al. Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. *Virus Res* [Internet]. 2005/10/10. 2006;116(1–2):91–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16219382>
10. Akondy RS, Johnson PLF, Nakaya HI, Edupuganti S, Mulligan MJ, Lawson B, et al. Initial viral load determines the magnitude of the human CD8 T cell response to yellow fever vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 10;112(10):3050–5.
11. Avelino-Silva VI, Thomazella MV, Marmorato MP, Correia CA, Dias JZC, Maestri A, et al. Viral Kinetics in Sylvatic Yellow Fever Cases. *J Infect Dis* [Internet]. 2023 Apr 26 [cited 2023 May 11];227(9):1097–103. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/227/9/1097/6783203>
12. Nóbrega Litvoc M, Gallafrio Novaes T, Igor M, Lopes F. Yellow fever - M Nóbrega Litvoc. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2018 [cited 2019 Nov 13];106(2):106–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.64.02.106>
13. Rogers DJ, Wilson AJ, Hay SI, Graham AJ. The global distribution of yellow fever and dengue. *Adv Parasitol* [Internet]. 2006;62:181–220. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16647971>
14. Higgs S. Yellow Fever Virus: Cause for Concern or Alarm? *Vector Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2016/07/11. 2016;16(8):499–500. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27399929>
15. Kallas EG, D’Elia Zanella LGFAB, Moreira CH V., Buccheri R, Diniz GBF, Castiñeiras ACP, et al. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(7):750–8.

16. Barrett AD. Yellow Fever in Angola and Beyond--The Problem of Vaccine Supply and Demand. *N Engl J Med* [Internet]. 2016/06/08. 2016;375(4):301–3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27276108>
17. Kraemer MUG, Faria NR, Reiner RC, Golding N, Nikolay B, Stasse S, 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*. 2017;17(3).
18. Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke GJ, Reusken C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *J Clin Virol* [Internet]. 2012/07/25. 2012;55(3):191–203. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22840968>
19. WHO | Yellow fever – Nigeria. WHO. 2017;
20. WHO | Yellow fever – Nigeria. WHO. 2019;
21. 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;02138(Xx):1–2.
22. Saúde. BM da. Não há registro confirmado de febre amarela urbana no Brasil [Internet]. 06/02/2018. 2018 [cited 2019 Nov 14]. p. 1. Available from: <http://saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42486-nao-ha-registro-confirmado-de-febre-amarela-urbana-no-brasil>
23. Pecego A, Romano M, Ramos DG, Anilton F, Araújo A, Pelissari M, et al. Yellow Fever in Brazil: Recommendations for Surveillance, Prevention and Control notA técnica Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle. *Epidemiol Serv Saúde*. 2011;20(1):101–6.
24. WHO, Organization. - World Health N V - 32. *Weekly Epidemiological Record*. Vol. 91. 2016.
25. Pan, Organization AH, World, Organization H. *Epidemiological Alert: Yellow Fever*. Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2016.
26. Governo do Estado de São Paulo. GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA PROF. ALEXANDRE VRANJAC DIVISÃO DE ZONOSSES E CENTRAL/CIEVS.
27. Ministério da Saúde. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil-2017/2018 [Internet]. [cited 2019 Nov 14]. Available from: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/08/Informe-FA.pdf>
28. Secretaria de Estado da Saúde G do E de SP. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO FEBRE AMARELA BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO FEBRE AMARELA.
29. Governo do Estado de São Paulo. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA FEBRE AMARELA. 2019.
30. Secretaria de Vigilância em Saúde. MONITORAMENTO DA SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA FEBRE AMARELA NO BRASIL [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 14]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao->
31. CVE. Fonte: SINANNET; Divisão de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses/CVE/CCD/SES-SP. Dados atualizados em 18/11/2019*. 2019;1–5.
32. Verma R, Khanna P, Chawla S. Yellow fever vaccine: an effective vaccine for travelers. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2013/09/20. 2014;10(1):126–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24056028>
33. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2001;1(1):11–

20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11871403>
34. Rollins D, Ramsey R, Parsh B. Yellow fever. *Nursing (Lond)* [Internet]. 2017 Sep [cited 2019 Nov 14];47(9):69–70. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00152193-201709000-00018>
35. Wilder-Smith A. Yellow fever - UpToDate [Internet]. [cited 2019 Nov 14]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/yellow-fever>
36. Frierson JG. The yellow fever vaccine: a history. *Yale J Biol Med* [Internet]. 2010;83(2):77–85. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20589188>
37. Chen LH, Hamer DH. Vaccination challenges in confronting the resurgent threat from yellow fever. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2017;318(17):1651–2.
38. World Health Organization. Weekly epidemiological record [Internet]. 2013 [cited 2019 Nov 14]. Available from: <http://www.who.int/wer>
39. Barbosa De Melo A, Da Silva MDPC, Magalhães MCF, Vega Gonzales Gil LH, Freese De Carvalho EM, Braga-Neto UM, et al. Description of a prospective 17DD yellow fever vaccine cohort in Recife, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Oct;85(4):739–47.
40. 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* [Internet]. 2009/06/10. 2009;21(3):308–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19520559>
41. Ferreira KV, Rochal KC, Caputto LZ, Fonseca ALA, Fonseca FLA. Histórico da febre amarela no Brasil e a importância da vacinação anti-amarela. *Arq Bras Ciências da Saúde*. 2011;36(1):40–7.
42. Ministério da Saúde. Vacinação Febre Amarela [Internet]. [cited 2019 Nov 18]. Available from: <http://www.saude.gov.br/o-ministro/920-saude-de-a-a-z/febre-amarela/10771-vacinacao-febre-amarela>
43. Ministério da Saúde. Nota Informativa nº94, de 2017/CGPNI/DEVIT/SVS/MST. 2017.
44. Johnston LJ, Halliday GM, King NJ. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2000;114(3):560–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692118>
45. Palucka AK. Dengue virus and dendritic cells. *Nat Med* [Internet]. 2000;6(7):748–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888920>
46. Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol* [Internet]. 2001;75(8):3501–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264339>
47. Ferreira CDC, Campi-Azevedo AC, Peruhype-Magalhães V, Costa-Pereira C, Albuquerque CPD, Muniz LF, et al. The 17D-204 and 17DD yellow fever vaccines: an overview of major similarities and subtle differences. *Expert Rev Vaccines*. 2018;17(1):79–90.
48. Mokaya J, Kimathi D, Lambe T, Warimwe GM. What Constitutes Protective Immunity Following Yellow Fever Vaccination? *Vaccines* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2023 May 12];9(6). Available from: [/pmc/articles/PMC8235545/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39235545/)
49. Waggoner JJ, Rojas A, Pinsky BA. Yellow fever virus: Diagnostics for a persistent arboviral threat. *J Clin Microbiol*. 2018;56(10).

50. Silva NIO, Sacchetto L, De Rezende IM, Trindade GDS, Labeaud AD, De Thoisy B, et al. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. *Virology J* [Internet]. 2020 Jan 23 [cited 2023 May 12];17(1):1–12. Available from: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-019-1277-7>
51. Vasconcelos PFC, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VLRS, et al. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: A report of two cases. *Lancet*. 2001 Jul 14;358(9276):91–7.
52. Martin M, Tsai TF, Cropp B, Chang GJJ, Holmes DA, Tseng J, et al. Fever and multisystem organ failure associated with 17D-204 yellow fever vaccination: A report of four cases. *Lancet*. 2001 Jul 14;358(9276):98–104.
53. Rudolph KE, Lessler J, Moloney RM, Kmush B, Cummings DAT. Review article: Incubation periods of mosquito-borne viral infections: a systematic review. Vol. 90, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2014. p. 882–91.
54. Johansson MA, Arana-Vizcarrondo N, Biggerstaff BJ, Staples JE. Incubation Periods of Yellow Fever Virus. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2010 Jul [cited 2023 May 12];83(1):183. Available from: [/pmc/articles/PMC2912597/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2912597/)
55. Martins MÂ, Silva ML, Elói-Santos SM, Ribeiro JGL, Peruhype-Magalhães V, Marciano APV, et al. Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. *Vaccine*. 2008 Feb 26;26(9):1173–84.
56. Marquardt N, Ivarsson MA, Blom K, Gonzalez VD, Braun M, Falconer K, et al. The Human NK Cell Response to Yellow Fever Virus 17D Is Primarily Governed by NK Cell Differentiation Independently of NK Cell Education. *J Immunol*. 2015 Oct 1;195(7):3262–72.
57. Poland JD, Calisher CH, Monath TP, Downs WG, Murphy K. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ*. 1981;59(6):895–900.
58. 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 Heal* [Internet]. 1999 Dec [cited 2019 Nov 18];4(12):867–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3156.1999.00496.x>
59. Fuertes Marraco SA, Sonesson C, Cagnon L, Gannon PO, Allard M, Maillard 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;7(282).
60. Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H, et al. The Yellow Fever Virus Vaccine Induces a Broad and Polyfunctional Human Memory CD8 + T Cell Response . *J Immunol*. 2009 Dec 15;183(12):7919–30.
61. Wieten RW, Jonker EFF, Van Leeuwen EMM, Remmerswaal EBM, Ten Berge IJM, De Visser AW, et al. A single 17D yellow fever vaccination provides lifelong immunity; characterization of yellow-fever-specific neutralizing antibody and T-cell responses after vaccination. *PLoS One*. 2016;11(3).
62. Neves PCC, Rudersdorf RA, Galler R, Bonaldo MC, Santana MG de, Mudd PA, et al. CD8+ gamma-delta TCR+ and CD4+ T cells produce IFN- γ at 5-7 days after yellow fever vaccination in Indian rhesus macaques, before the induction of classical antigen-specific T cell responses. *Vaccine*. 2010 Nov 29;28(51):8183–8.

63. James EA, LaFond RE, Gates TJ, Mai DT, Malhotra U, Kwok WW. Yellow Fever Vaccination Elicits Broad Functional CD4 + T Cell Responses That Recognize Structural and Nonstructural Proteins . *J Virol*. 2013 Dec 1;87(23):12794–804.
64. Monath TP, Barrett ADT. Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever. *Adv Virus Res*. 2003;60(February 2003):343–95.
65. Ahmed R, Akondy RS. Insights into human CD8+ T-cell memory using the yellow fever and smallpox vaccines. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(3):340–5.
66. Campi-Azevedo AC, Costa-Pereira C, Antonelli LR, Fonseca CT, Teixeira-Carvalho A, Villela-Rezende G, et al. Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. *Hum Vaccines Immunother*. 2016;12(2):491–502.
67. Santos AP, Matos DCS, Bertho AL, Mendonça SCF, Marcovistz R. Detection of TH1/TH2 cytokine signatures in yellow fever 17DD first-time vaccinees through ELISpot assay. *Cytokine*. 2008;42(2):152–5.
68. Richards DM, Delacher M, Goldfarb Y, Kägebein D, Hofer AC, Abramson J, et al. Treg Cell Differentiation: From Thymus to Peripheral Tissue [Internet]. 1st ed. Vol. 136, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc.; 2015. 175–205 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.014>
69. Blom K, Braun M, Ivarsson MA, Gonzalez VD, Falconer K, Moll M, et al. Temporal Dynamics of the Primary Human T Cell Response to Yellow Fever Virus 17D As It Matures from an Effector- to a Memory-Type Response. *J Immunol*. 2013 Mar 1;190(5):2150–8.
70. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8^a Edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.
71. Kohler S, Bethke N, Böthe M, Sommerick S, Frensch M, Romagnani C, et al. The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination. *Eur J Immunol*. 2012;42(9):2363–73.
72. Liang TC. Epitopes. *Encycl Immunol*. 1998 Jan 1;825–7.
73. Liu X, Zhao Y, Qi H. T-independent antigen induces humoral memory through germinal centers. *J Exp Med*. 2022 Jan 12;219(3).
74. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure-function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol* [Internet]. 2019 Mar 3 [cited 2023 May 14];4(33). Available from: [/pmc/articles/PMC6495537/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3495537/)
75. Tellier J, Nutt SL. Plasma cells: The programming of an antibody-secreting machine. *Eur J Immunol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Apr 21];49(1):30–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201847517>
76. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):160–71.
77. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. Vol. 131, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013. p. 959–71.
78. Pape KA, Kouskoff V, Nemazee D, Tang HL, Cyster JG, Tze LE, et al. Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response. *J Exp Med*. 2003 Jun 16;197(12):1677–87.
79. Khodadadi L, Cheng Q, Radbruch A, Hiepe F. The Maintenance of Memory Plasma Cells. *Front Immunol*. 2019 Apr 5;10:721.
80. Martins MA, Silva ML, Marciano AP, Peruhype-Magalhães V, Eloi-Santos SM, Ribeiro J, 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* [Internet]. 2007;148(1):90–100. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17309541>
81. Holgado MP, Sananez I, Raiden S, Geffner JR, Arruvito L. CD32 ligation promotes the activation of CD4+T cells. *Front Immunol*. 2018 Nov 30;9(NOV).
 82. Liu C, Richard K, Wiggins M, Zhu X, Conrad DH, Song W. CD23 can negatively regulate B-cell receptor signaling. *Sci Rep*. 2016 May 16;6.
 83. Sandberg JT, Ols S, Löfling M, Varnaitė R, Lindgren G, Nilsson O, et al. Activation and Kinetics of Circulating T Follicular Helper Cells, Specific Plasmablast Response, and Development of Neutralizing Antibodies following Yellow Fever Virus Vaccination. *J Immunol* [Internet]. 2021 Jul 28 [cited 2021 Jul 30];ji2001381. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/early/2021/07/28/jimmunol.2001381>
 84. Vasconcelos PFC. Single shot of 17D vaccine may not confer life-long protection against yellow fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(2).
 85. Wieten RW, Jonker EFF, Van Leeuwen EMM, Remmerswaal EBM, Ten Berge IJM, De Visser AW, et al. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination. *PLoS One* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2023 May 12];11(3). Available from: [/pmc/articles/PMC4792480/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24792480/)
 86. Monath TPC. Neutralizing antibody responses in the major immunoglobulin classes to yellow fever 17d vaccination of humans. *Am J Epidemiol*. 1971;93(2):122–9.
 87. Gibney KB, Edupuganti S, Panella AJ, Kosoy OI, Delorey MJ, Lanciotti RS, et al. Detection of anti-yellow fever virus immunoglobulin M antibodies at 3-4 years following yellow fever vaccination. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Dec;87(6):1112–5.
 88. Watson AM, Lam LKM, Klimstra WB, Ryman KD. The 17D-204 Vaccine Strain-Induced Protection against Virulent Yellow Fever Virus Is Mediated by Humoral Immunity and CD4+ but not CD8+ T Cells. *PLoS Pathog*. 2016 Jul 1;12(7).
 89. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol*. 2009;10(1):116–25.
 90. Bethke N. Characterisation of the immune response after yellow fever vaccination. Vol. Doctor med, Berlin-Brandenburg Zentrum für Regenerative Therapien der Medizinischen Fakultät Charité. [Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin]: Universitätsmedizin Berlin; 2011.
 91. Varga I, Babala J, Kachlik D. Anatomic variations of the spleen: current state of terminology, classification, and embryological background. Vol. 40, *Surgical and Radiologic Anatomy*. Springer-Verlag France; 2018. p. 21–9.
 92. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. Vol. 5, *Nature Reviews Immunology*. 2005. p. 606–16.
 93. Steiniger BS. Human spleen microanatomy: Why mice do not suffice. *Immunology*. 2015 Jul 1;145(3):334–46.
 94. Kraus MD. Splenic histology and histopathology: An update. *Semin Diagn Pathol*. 2003;20(2):84–93.
 95. Lane PJJ, McConnell FM, Withers D. Single complexity: The spleen. *Dev Biol Peripher Lymphoid Organs*. 2011;119–20.
 96. Yu P, Wang Y, Chin RK, Martinez-Pomares L, Gordon S, Kosco-Vibois MH, et

- al. B Cells Control the Migration of a Subset of Dendritic Cells into B Cell Follicles Via CXCL13 Chemokine Ligand 13 in a Lymphotoxin-Dependent Fashion. *J Immunol*. 2002 May 15;168(10):5117–23.
97. Cerutti A, Colonna M. Marginal zone B cells: virtues of innatelike antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):118–32.
 98. McGaha TL, Chen Y, Ravishankar B, Rooijen N Van, Karlsson MCI. Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. *Blood*. 2011;117(20):5403–12.
 99. Oehen S, Odermatt B, Karrer U, Hengartner H, Zinkernagel R, López-Macías C. Marginal Zone Macrophages and Immune Responses Against Viruses. *J Immunol*. 2002 Aug 1;169(3):1453–8.
 100. Turner VM, Mabbott NA. Influence of ageing on the microarchitecture of the spleen and lymph nodes. Vol. 18, *Biogerontology*. Springer Netherlands; 2017. p. 723–38.
 101. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXCR5 chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med*. 1999 Oct 18;190(8):1123–34.
 102. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med*. 2001;194(1):45–56.
 103. Garcia de Vinuesa C, Vinuesa D, Gulbranson-Judge A, Khan M, O’Leary P, Cascalho M, et al. Dendritic cells associated with plasmablast survival. *Eur J Immunol*. 1999;29(11):3712–21.
 104. Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul [Internet]*. 1989 [cited 2023 Apr 21];1(1):27. Available from: /pmc/articles/PMC361422/?report=abstract
 105. Mickael ME, Bieńkowska I, Sacharczuk M. An Update on the Evolutionary History of Bregs. *Genes (Basel) [Internet]*. 2022 May 1 [cited 2023 May 16];13(5). Available from: /pmc/articles/PMC9141580/
 106. Klotz O, Belt TH. The pathology of the spleen in yellow fever. *Am J Pathol*. 1930;6(6):655–62.
 107. Klotz O, Simpsom W. The Spleen in West African Yellow Fever. *Am J Pathol*. 1927;3(5):483–8.
 108. Monath TP, Brinker KR, Chandler FW, Kemp GE, Cropp CB. Pathophysiologic correlations in a rhesus monkey model of yellow fever. With special observations on the acute necrosis of B cell areas of lymphoid tissues. *Am J Trop Med Hyg*. 1981;30(2):431–43.
 109. Durham HE. Report of the Yellow Fever Expedition to Parà of the Liverpool School of Tropical Medicine. *Nature*. 1902 Dec;67(1730):172–3.
 110. Bae HG, Drosten C, Emmerich P, Colebunders R, Hantson P, Pest S, et al. Analysis of two imported cases of yellow fever infection from Ivory Coast and the Gambia to Germany and Belgium. *J Clin Virol*. 2005 Aug;33(4):274–80.
 111. Engelmann F, Josset L, Girke T, Park B, Barron A, Dewane J, et al. Pathophysiologic and Transcriptomic Analyses of Viscerotropic Yellow Fever in a Rhesus Macaque Model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(11).
 112. Duarte-Neto AN, Monteiro RA de A, Johnsson J, Cunha M dos P, Pour SZ, Saraiva AC, et al. Ultrasound-guided minimally invasive autopsy as a tool for rapid post-mortem diagnosis in the 2018 Sao Paulo yellow fever epidemic: Correlation with conventional autopsy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(7):1–15.

113. Duarte-Neto AN, Cunha M dos P, Marcilio I, Song ATW, de Martino RB, Ho YL, et al. Yellow fever and orthotopic liver transplantation: new insights from the autopsy room for an old but re-emerging disease. *Histopathology*. 2019;75(5):638–48.
114. Fink K. Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. *Front Immunol* [Internet]. 2012/04/17. 2012;3:78. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566959>
115. Priyamvada L, Cho A, Onlamoon N, Zheng NY, Huang M, Kovalenkov Y, et al. B Cell Responses during Secondary Dengue Virus Infection Are Dominated by Highly Cross-Reactive, Memory-Derived Plasmablasts. *J Virol* [Internet]. 2016/05/27. 2016;90(12):5574–85. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27030262>
116. Wrammert J, Onlamoon N, Akondy RS, Perng GC, Polsrila K, Chandele A, et al. Rapid and massive virus-specific plasmablast responses during acute dengue virus infection in humans. *J Virol* [Internet]. 2012/01/11. 2012;86(6):2911–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238318>
117. Ricciardi MJ, Magnani DM, Grifoni A, Kwon YC, Gutman MJ, Grubaugh ND, 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 Negl Trop Dis*. 2017;11(12):23.
118. Cattoretto G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, et al. BCL-6 Protein Is Expressed in Germinal-Center B Cells. *Blood*. 1995 Jul 1;86(1):45–53.
119. Cook JR, Craig FE, Swerdlow SH. Benign CD10-Positive T Cells in Reactive Lymphoid Proliferations and B-Cell Lymphomas. *Mod Pathol* 2003 169 [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2021 Oct 18];16(9):879–85. Available from: <https://www.nature.com/articles/3880858>
120. McMillan JKP, O'Donnell P, Chang SP. Pattern recognition receptor ligand-induced differentiation of human transitional B cells. *PLoS One* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2023 Aug 31];17(8). Available from: </pmc/articles/PMC9426890/>
121. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2023 Aug 18];276(1):121. Available from: </pmc/articles/PMC5338647/>
122. Kang S, Brown HM, Hwang S. Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. *Immune Netw* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 Aug 25];18(5). Available from: </pmc/articles/PMC6215902/>
123. Iyer SS, Cheng G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2023 Aug 23];32(1):23. Available from: </pmc/articles/PMC3410706/>
124. Sun L, He C, Nair L, Yeung J, Egwuagu CE. Interleukin 12 (IL-12) Family Cytokines: Role in Immune Pathogenesis and Treatment of CNS Autoimmune Disease. *Cytokine* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2023 Aug 23];75(2):249. Available from: </pmc/articles/PMC4553122/>
125. Drake LY, Kita H. IL-33: Biological Properties, Functions and Roles in Airway Disease. *Immunol Rev* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2023 Aug 23];278(1):173. Available from: </pmc/articles/PMC5492954/>
126. Valente G, Ozmen L, Novelli F, Geuna M, Palestro G, Forni G, et al. Distribution of interferon- γ receptor in human tissues. *Eur J Immunol* [Internet]. 1992 Sep 1 [cited 2023 Aug 21];22(9):2403–12. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.1830220933>
127. Wei T, Simko V, Levy M, Xie Y, Jin YJ, Zemla J. Visualization of a Correlation

- Matrix. R package “corrplot”. [Internet]. Vol. 56, Statistician. 2021 [cited 2023 Sep 10]. p. 316–324. Available from: <https://github.com/taiyun/corrplot>
128. Costa PR, Correia CA, Marmorato MP, Dias JZ de C, Thomazella MV, Cabral da Silva A, et al. Humoral and cellular immune responses to CoronaVac up to one year after vaccination. *Front Immunol*. 2022 Oct 21;13:6285.
 129. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell* [Internet]. 2020 Nov 12 [cited 2022 Mar 30];183(4):996. Available from: </pmc/articles/PMC7494270/>
 130. Rosenfeld LG, Malta DC, Szwarcwald CL, Bacal NS, Cuder MAM, Pereira CA, et al. Valores de referência para exames laboratoriais de hemograma da população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde. *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. 2019 Oct 7 [cited 2023 May 27];22:E190003.SUPL.2. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbepid/a/79JFJqJnBqcpqFL4CHVGdxS>
 131. Szwarcwald CL, Malta DC, Pereira CA, Figueiredo AW, de Almeida W da S, Machado IE, et al. Valores de referência para exames laboratoriais de colesterol, hemoglobina glicosilada e creatinina da população adulta brasileira. *Rev Bras Epidemiol*. 2019 Oct 7;22(2):e190002.supl.2.
 132. Kumar B V., Connors T, Farber DL. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity* [Internet]. 2018 Feb 20 [cited 2021 Oct 18];48(2):202. Available from: </pmc/articles/PMC5826622/>
 133. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2010 [cited 2021 Oct 29];162(2):271. Available from: </pmc/articles/PMC2996594/>
 134. Blanco E, Pérez-Andrés M, Arriba-Méndez S, Contreras-Sanfeliciano T, Criado I, Pelak O, et al. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Oct 29];141(6):2208-2219.e16. Available from: <http://www.jacionline.org/article/S0091674918303051/fulltext>
 135. Shankwitz K, Pallikkuth S, Sirupangi T, Kirk Kvistad D, Russel KB, Pahwa R, et al. Compromised steady-state germinal center activity with age in nonhuman primates. *Aging Cell* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2023 Jun 29];19(2). Available from: </pmc/articles/PMC6996951/>
 136. Lee J Le, Fra-Bido SC, Burton AR, Innocentin S, Hill DL, Linterman MA. B cell-intrinsic changes with age do not impact antibody-secreting cell formation but delay B cell participation in the germinal centre reaction. *Aging Cell* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2022 Oct 6];21(9):e13692. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ace1.13692>
 137. Pereira SA, Corrêa BS, Minicucci GP, Lopes GM, Castro EC, dos Reis MA, et al. O peso do baço em chagásicos crônicos. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 1999 [cited 2023 Jul 14];32(2):167–70. Available from: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/wBHmgVpVL7sNrqpBdXtvWXN/?lang=pt>
 138. Kotani H, Miyao M, Manabe S, Ishida T, Kawai C, Abiru H, et al. Relationship of red splenic arteriolar hyaline with rapid death: a clinicopathological study of 82 autopsy cases. *Diagn Pathol* [Internet]. 2012 Dec 31 [cited 2023 Jul 26];7(1):182. Available from: </pmc/articles/PMC3542261/>
 139. Janka GE, Lehmborg K. Hemophagocytic syndromes — An update. *Blood Rev*. 2014 Jul 1;28(4):135–42.
 140. Giugni FR, Aiello VD, Faria CS, Pour SZ, Cunha M dos P, Giugni MV, et al.

- Understanding yellow fever-associated myocardial injury: an autopsy study. *eBioMedicine* [Internet]. 2023 Oct 1 [cited 2023 Oct 30];96:104810. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2352396423003766/fulltext>
141. Srikiatkachorn A, Mathew A, Rothman AL. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2023 Aug 2];39(5):563–74. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00281-017-0625-1>
 142. Yong YK, Wong WF, Vignesh R, Chattopadhyay I, Velu V, Tan HY, et al. Dengue Infection - Recent Advances in Disease Pathogenesis in the Era of COVID-19. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Jul 6 [cited 2023 May 16];13. Available from: [/pmc/articles/PMC9299105/](https://pmc/articles/PMC9299105/)
 143. Leal SG, Romano APM, Monteiro RV, de Melo CB, Vasconcelos PF da C, de Castro MB. Frequency of histopathological changes in howler monkeys (*Alouatta* sp.) naturally infected with yellow fever virus in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;
 144. Ferreira MS, Bezerra Júnior PS, Cerqueira VD, Rivero GRC, Oliveira Júnior CA, Castro PHG, et al. Experimental yellow fever virus infection in the squirrel monkey (*Saimiri* spp.) I: Gross anatomical and histopathological findings in organs at necropsy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2020 [cited 2020 Dec 13];115(10):1–8. Available from: <https://orcid.org/0000-0002-6603-5527>
 145. Guimarães A, Oliveira MC, Kierulff MCM, Mendonça-Furtado O, Baptista MNM, Mendes SL, et al. Epidemiologic profile and histopathological findings in Neotropical Primates during and after the yellow fever outbreak in Espírito Santo, Brazil. *An Acad Bras Cienc* [Internet]. 2022 Sep 5 [cited 2022 Sep 26];94:20211229. Available from: <http://www.scielo.br/j/aabc/a/Y6w54cwqpFxd8zykfTvZbj/?lang=en>
 146. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4+ T Lymphocytes in Humans. *J Immunol* [Internet]. 2001 Jun 1 [cited 2021 Oct 17];166(11):6952–63. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/166/11/6952>
 147. Duarte-Neto AN, Croda J, Pagliari C, Soriano FG, Carlos Nicodemo A, Irma Seixas Duarte M. Severe leptospirosis features in the spleen indicate cellular immunosuppression similar to that found in septic shock. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2023 Sep 16];10(APR):920. Available from: [/pmc/articles/PMC6503108/](https://pmc/articles/PMC6503108/)
 148. Ramanlal R, Gupta V. Physiology, Vasodilation. *StatPearls* [Internet]. 2023 Jan 23 [cited 2023 Jul 7]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557562/>
 149. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2013 Nov 9 [cited 2023 Jul 9];9(10):1057. Available from: [/pmc/articles/PMC3831119/](https://pmc/articles/PMC3831119/)
 150. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *Fems Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2008 Aug [cited 2023 Jul 9];53(3):287. Available from: [/pmc/articles/PMC7110366/](https://pmc/articles/PMC7110366/)
 151. Meuren LM, Prestes EB, Papa MP, de Carvalho LRP, Mustafá YM, da Costa LS, et al. Infection of Endothelial Cells by Dengue Virus Induces ROS Production by Different Sources Affecting Virus Replication, Cellular Activation, Death and Vascular Permeability. *Front Immunol*. 2022 Feb 2;13:810376.

152. Malavige GN, Ogg GS. Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2023 Jul 9];151(3):261. Available from: [/pmc/articles/PMC5461104/](#)
153. Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol*. 1994;153(8).
154. Koziak K, Sévigny J, Robson SC, Siegel JB, Kaczmarek E. Analysis of CD39/ATP Diphosphohydrolase (ATPDase) Expression in Endothelial Cells, Platelets and Leukocytes. *Thromb Haemost*. 1999;82(5):1538–44.
155. Huntington ND, Xu Y, Puthalakath H, Light A, Willis SN, Strasser A, et al. CD45 links the B cell receptor with cell survival and is required for the persistence of germinal centers. *Nat Immunol* 2005 72 [Internet]. 2005 Dec 25 [cited 2021 Oct 12];7(2):190–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni1292>
156. Bradley BT, Maioli H, Johnston R, Chaudhry I, Fink SL, Xu H, et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2021 Oct 12];396(10247):320. Available from: [/pmc/articles/PMC7365650/](#)
157. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* [Internet]. 2013 Jun [cited 2023 Aug 18];19(6):355. Available from: [/pmc/articles/PMC3674206/](#)
158. Nascimento DC, Viacava PR, Ferreira RG, Damaceno MA, Piñeros AR, Melo PH, et al. Sepsis expands a CD39+ plasmablast population that promotes immunosuppression via adenosine-mediated inhibition of macrophage antimicrobial activity. *Immunity*. 2021 Sep 14;54(9):2024-2041.e8.
159. Zhan J, Deng R, Tang J, Zhang B, Tang Y, Wang JK, et al. The spleen as a target in severe acute respiratory syndrome. *FASEB J*. 2006;20(13):2321–8.
160. Ping H, Zhang K, Wang Y, Tong X, Chen Z, Cai C, et al. Cell death and pathological findings of the spleen in COVID-19 patients. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Aug 7];227:153610. Available from: [/pmc/articles/PMC8423775/](#)
161. Melo JM, Falcão LFM, da Ponte LCT, Silva CC, Martins LC, Chiang JO, et al. Emergence of New Immunopathogenic Factors in Human Yellow Fever: Polarisation of the M1/M2 Macrophage Response in the Renal Parenchyma. *Viruses*. 2022;14(8):1–10.
162. Quaresma JAS, Barros VLRS, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade HF, Vasconcelos PFC, et al. Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2023 Aug 18];101(2):161–8. Available from: <https://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.02.019>
163. Menêses MOS de C, Etchebehere RM, De Araújo MF, Duque ACDR, Rodrigues DBR, Pereira SA de L. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Autopsied Adults: Clinical, Laboratory and Immunohistochemical Evaluation for CD68 and CD57. Case Report and Literature Review. *J Heal Sci*. 2019;21(4):422–8.
164. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of NK cell development. *Trends Immunol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2023 Aug 21];34(12):573–82. Available from: [/pmc/articles/PMC3852183/](#)
165. Grégoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E, et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* [Internet]. 2007 Dec [cited 2023

- Aug 21];220(1):169. Available from: /pmc/articles/PMC7165697/
166. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal Centers. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2012 Apr 23 [cited 2021 Feb 2];30(1):429–57. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>
 167. Xia X, Xiaona C, Huaxiong P, Hua S, Bo H, Ming Y, et al. Pathological changes of the spleen in ten patients with coronavirus disease 2019(COVID-19) by postmortem needle autopsy. *Chinese J Pathol*. 2020 Jun 8;49(06):576–82.
 168. Bovay A, Speiser DE, Fuertes Marraco SA. Early drop of circulating T cells negatively correlates with the protective immune response to Yellow Fever vaccination. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2020 [cited 2023 Aug 22];16(12):3103. Available from: /pmc/articles/PMC8641580/
 169. Velásquez-Lopera MM, Correa LA, García LF. Human spleen contains different subsets of dendritic cells and regulatory T lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 2008;154(1):107–14.
 170. Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN- γ receptors. *Allergy* [Internet]. 1999 [cited 2023 Aug 23];54(12):1233. Available from: /pmc/articles/PMC4154595/
 171. Silva ML, Martins MA, Espirito-Santo LR, Campi-Azevedo AC, Silveira-Lemos D, Ribeiro JGL, et al. Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. *Vaccine* [Internet]. 2011;29(3):583–92. Available from: %3CGo
 172. Hummelshoj L, Ryder LP, Poulsen LK. The Role of the interleukin-10 Subfamily Members in Immunoglobulin Production by Human B Cells. *Scand J Immunol* [Internet]. 2006 Jul 1 [cited 2023 Jun 7];64(1):40–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3083.2006.01773.x>
 173. Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL, O’Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol191683> [Internet]. 2003 Nov 28 [cited 2023 Aug 25];19:683–765. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
 174. Woodson SE, Freiberg AN, Holbrook MR. Differential cytokine responses from primary human Kupffer cells following infection with wild-type or vaccine strain yellow fever virus. *Virology*. 2011 Mar 30;412(1):188–95.
 175. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2021 Oct 24];112(5):1570. Available from: /pmc/articles/PMC2518873/
 176. Pavlasova G, Mraz M. The regulation and function of CD20: an “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Oct 24];105(6):1494. Available from: /pmc/articles/PMC7271567/
 177. Ihlow J, Michaelis E, Greuel S, Heynol V, Lehmann A, Radbruch H, et al. B cell depletion and signs of sepsis-acquired immunodeficiency in bone marrow and spleen of COVID-19 deceased. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 Oct 12];103:628. Available from: /pmc/articles/PMC7776126/
 178. Fernandes NCC de A, Cunha MS, Guerra JM, Diaz-Delgado J, Ressio RA, Cirqueira CS, et al. Yellow Fever as Cause of Death of Titi Monkeys (*Callicebus* Spp.). *Vet Pathol*. 2021;030098582110097.
 179. Havenar-Daughton C, Lindqvist M, Heit A, Wu JE, Reiss SM, Kendric K, et al. CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Mar 8 [cited 2023 Aug 29];113(10):2702–7. Available from: /pmc/articles/PMC4790995/

180. Cattoretti G, Pasqualucci L, Ballon G, Tam W, Nandula S V., Shen Q, et al. Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell*. 2005 May 1;7(5):445–55.
181. Novak K. Ups and downs. *Nat Rev Cancer* 2005 51 [Internet]. 2005 [cited 2023 Aug 29];5(1):9–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc1539>
182. Wagner SD, Ahearne M, Ferrigno PK. The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy. *Br J Haematol* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2023 Aug 30];152(1):3–12. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.2010.08420.x>
183. Duy C, Yu JJ, Nahar R, Swaminathan S, Kweon SM, Polo JM, et al. BCL6 is critical for the development of a diverse primary B cell repertoire. *J Exp Med* [Internet]. 2010 Jun 6 [cited 2023 Aug 30];207(6):1209. Available from: </pmc/articles/PMC2882829/>
184. Fukuda T, Yoshida T, Okada S, Hatano M, Miki T, Ishibashi K, et al. Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med*. 1997;186(3):439–48.
185. Robinson MJ, Ding Z, Pitt C, Brodie EJ, Quast I, Tarlinton DM, et al. The Amount of BCL6 in B Cells Shortly after Antigen Engagement Determines Their Representation in Subsequent Germinal Centers. *Cell Rep* [Internet]. 2020 Feb 4 [cited 2023 Aug 30];30(5):1530-1541.e4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32023467/>
186. Kitano M, Moriyama S, Ando Y, Hikida M, Mori Y, Kurosaki T, et al. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* [Internet]. 2011 Jun 24 [cited 2023 Aug 30];34(6):961–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21636294/>
187. Kaneko N, Kuo HH, Boucau J, Farmer JR, Allard-Chamard H, Mahajan VS, et al. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell* [Internet]. 2020 Oct 10 [cited 2023 May 27];183(1):143. Available from: </pmc/articles/PMC7437499/>
188. Colovai AI, Giatzikis C, Ho EK, Farooqi M, Suci-Foca N, Cattoretti G, et al. Flow cytometric analysis of normal and reactive spleen. *Mod Pathol* 2004 178 [Internet]. 2004 Apr 23 [cited 2021 Oct 17];17(8):918–27. Available from: <https://www.nature.com/articles/3800141>
189. Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(6):846–52.
190. Laurent C, Fazilleau N, Brousset P. A novel subset of T-helper cells: Follicular T-helper cells and their markers. *Haematologica*. 2010;95(3):356–8.
191. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 2009 911 [Internet]. 2009 Nov [cited 2023 Sep 2];9(11):767–77. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri2656>
192. Atisha-Fregoso Y, Zou YR, Diamond B. B Cells and Generation of Antibodies. *Dubois' Lupus Erythematosus Relat Syndr*. 2019 Jan 1;101–15.
193. Kind S, Merenkow C, Büscheck F, Möller K, Dum D, Chirico V, et al. Prevalence of Syndecan-1 (CD138) Expression in Different Kinds of Human Tumors and Normal Tissues. *Dis Markers* [Internet]. 2019 [cited 2023 Apr 21];2019. Available from: </pmc/articles/PMC6954471/>
194. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138– and CD138+ plasma cells.

- Haematologica [Internet]. 2010 Jun [cited 2023 Mar 20];95(6):1016. Available from: [/pmc/articles/PMC2878802/](#)
195. Neumann B, Klippert A, Raue K, Sopper S, Stahl-Hennig C. Characterization of B and plasma cells in blood, bone marrow, and secondary lymphoid organs of rhesus macaques by multicolor flow cytometry. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2023 Mar 20];97(1):19–30. Available from: <https://academic.oup.com/jleukbio/article/97/1/19/6975037>
 196. Jaffe, Elaine Sarkin; Arber, Daniel A.; Campo, Elias; Quintanilla-Fend, Leticia; Orazi A. *Hematopathology*. 2nd Editio. Elsevier; 2016. 1216 p.
 197. Hong S, Lee HW, Chang D-Y, You S, Kim J, Park JY, et al. Antibody-Secreting Cells with a Phenotype of Ki-67low, CD138high, CD31high, and CD38high Secrete Nonspecific IgM during Primary Hepatitis A Virus Infection. *J Immunol* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2023 Apr 1];191(1):127–34. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/191/1/127/104357/Antibody-Secreting-Cells-with-a-Phenotype-of-Ki>
 198. Jaimes MC, Rojas OL, Kunkel EJ, Lazarus NH, Soler D, Butcher EC, et al. Maturation and Trafficking Markers on Rotavirus-Specific B Cells during Acute Infection and Convalescence in Children. *J Virol* [Internet]. 2004 Oct 15 [cited 2023 Mar 20];78(20):10967. Available from: [/pmc/articles/PMC521846/](#)
 199. Kunkel EJ, Butcher EC. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* 2003 310 [Internet]. 2003 [cited 2023 Sep 8];3(10):822–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri1203>
 200. Ellyard JI, Avery DT, Mackay CR, Tangye SG. Contribution of stromal cells to the migration, function and retention of plasma cells in human spleen: Potential roles of CXCL12, IL-6 and CD54. *Eur J Immunol*. 2005;35(3):699–708.
 201. Pak HK, Nam B, Lee YK, Kim YW, Roh J, Son J, et al. Human Plasmablast Migration Toward CXCL12 Requires Glucose Oxidation by Enhanced Pyruvate Dehydrogenase Activity via AKT. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Jul 27 [cited 2023 May 15];9:27. Available from: [/pmc/articles/PMC6072847/](#)
 202. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 Mar 27 [cited 2023 Sep 8];15(3):137. Available from: [/pmc/articles/PMC4399774/](#)
 203. Malisan F, Brière F, Bridon JM, Harindranath N, Mills FC, Max EE, et al. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med*. 1996;183(3):937–47.
 204. Faustino LD, Griffith JW, Rahimi RA, Nepal K, Hamilos DL, Cho JL, et al. Interleukin-33 activates regulatory T cells to suppress innate $\gamma\delta$ T cell responses in the lung. *Nat Immunol* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Sep 8];21(11):1371. Available from: [/pmc/articles/PMC7578082/](#)
 205. Baum M, Geitner T, Liesen H. The role of the spleen in the leucocytosis of exercise: Consequences for physiology and pathophysiology. *Int J Sports Med*. 1996;17(8):604–7.
 206. Ise W, Inoue T, McLachlan JB, Kometani K, Kubo M, Okada T, et al. Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Aug 12 [cited 2023 Aug 30];111(32):11792–7. Available from: [/pmc/articles/PMC4136626/](#)