

# Dengue: patogénesis y estado actual del desarrollo de vacunas

**Ernesto Marcos López y Carlos López Abarrategui.\***

Departamento de Biología Molecular, División de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: ernesto.marcos@cnic.edu.cu

\*Proyecto Vacuna Dengue, División de Vacunas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado postal 6162, Avenida 31 entre Calles 158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 9 de octubre de 2008.

Aceptado: 14 de enero de 2009.

Palabras clave: dengue, patogénesis, inmunopatogénesis, virus atenuado, vacunas.  
Key words: dengue, pathogenesis, immunopathogenesis, attenuated virus, vaccines.

**RESUMEN.** El Dengue es una enfermedad causada por el virus Dengue y es transmitida al hombre por la picadura de un mosquito infectado, principalmente el *Aedes aegypti*. El número de casos de Fiebre del Dengue y Fiebre Hemorrágica del Dengue aumenta dramáticamente en el mundo cada año. Se estima que alrededor de 3 000 millones de personas viven en áreas de riesgo, de las cuales los niños constituyen el grupo poblacional más vulnerable. El desarrollo de una vacuna efectiva y segura contra la enfermedad es actualmente una necesidad mundial, designado como una prioridad por la Organización Mundial de la Salud. Muchas estrategias están actualmente en investigación, incluyendo vacunas atenuadas e inactivadas, y recombinantes. Sin embargo, debido a que las formulaciones finales deben estar dirigidas contra los cuatro serotipos virales, los actuales candidatos vacunales han tenido que afrontar varios retos. Uno de los más importantes es la interferencia en la estimulación inmune de los antígenos de los cuatro serotipos, que pudieran conducir a una respuesta desbalanceada y aumentar el riesgo de desencadenar Fiebre Hemorrágica del Dengue por exposición subsiguiente al virus salvaje. El presente trabajo aborda la patogénesis de la enfermedad, resume el estado actual de los candidatos vacunales más avanzados y discute los retos principales que ha tenido que enfrentar el desarrollo de una vacuna tetravalente contra el virus Dengue.

**ABSTRACT.** Dengue is a disease caused by Dengue virus and it is transmitted to humans by the bite of infected mosquitoes, mainly the *Aedes aegypti*. It has been estimated that about 3 000 million people live in risk areas and children are the most vulnerable group. Therefore, the development of an effective and safe vaccine is currently a global need and a priority for the World Health Organization. There are many strategies under research, including inactivated, live attenuated and recombinant vaccines. However, since the final formulation must be targeted against all the four serotypes, current vaccine candidates must overcome many challenges. One of the main problems is the interference of the immune stimulation among the antigens of the four serotypes, which could lead to an unbalanced response and thus, increase the risk of triggering Dengue Hemorrhagic Fever by further infection with the wild type virus. This manuscript deals with Dengue pathogenesis and reviews current status of the most advanced vaccine candidates. Furthermore, the main challenges to overcome in the development of a tetravalent Dengue vaccine are also discussed.

## INTRODUCCIÓN

El Dengue es una enfermedad causada por el virus Dengue (VD) y es transmitida al hombre por la picadura de un mosquito infectado, principalmente el *Aedes aegypti*. Existen cuatro serotipos virales genéticamente relacionados: Dengue 1, 2, 3 y 4 (Den 1-4); los cuales pueden ser distinguidos por anticuerpos (Acs) neutralizantes.<sup>1</sup> La infección por uno cualquiera de los cuatro serotipos puede ser asintomática o dar lugar a uno de dos cuadros clínicos: una enfermedad benigna, la Fiebre del Dengue o Dengue Clásico (FD) u ocasionar una forma más severa de ella, conocida como Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD), potencialmente fatal para quien la padece.<sup>2</sup> La infección por un serotipo del virus confiere inmunidad duradera para el serotipo homólogo, no siendo así para el resto de los serotipos. Debido a esto, las infecciones secundarias con serotipos heterólogos son muy comunes.

Siguiendo un período de incubación de 3 a 7 d, la FD se presenta con ascenso repentino de la temperatura, cefalea, dolor retroocular, dolor en los huesos, mialgia, náuseas, vómitos y astenia.<sup>3,4</sup> Las manifestaciones hemorrágicas en pacientes con FD son frecuentes y varían entre moderadas y severas, incluyendo petequias, sangramiento en las encías, epistaxis, menorragia y hemorragia gastrointestinal. Se ha reportado la elevación de la concentración sérica de algunas transaminasas hepáticas, lo que involucra al hígado en la infección por Dengue.<sup>5</sup>

Inicialmente, la FHD es difícil de distinguir de la FD, pero el deterioro del paciente ocurre rápidamente con manifestaciones hemorrágicas, incluyendo extravasación de plasma y sangramiento.<sup>4</sup> Alrededor del cuarto día puede aparecer el SCD, que dura de 12 a 24 h y que no guarda proporción con la pérdida manifiesta de sangre. Puede haber hepatomegalia dolorosa y además, ascitis, derrame pleural, ictero o síntomas neurológicos. En los casos en que se produce el SCD, la duración de este es

relativamente corta. El paciente puede morir en un plazo de 8 a 24 h si no recibe el tratamiento apropiado.<sup>3</sup>

Debido a que no existe un tratamiento específico para la enfermedad, las medidas preventivas, ya sea el control del vector como medidas de protección personal, cumplen un papel principal. Estas son difíciles de aplicar y mantener y son extremadamente caras. El mejor método para la prevención sería entonces el desarrollo de una vacuna efectiva y segura dirigida contra los cuatro serotipos del VD. Este desarrollo se ha convertido en una necesidad urgente, en particular para los niños que viven en áreas epidémicas.<sup>6</sup>

El presente trabajo aborda la patogénesis de la enfermedad, resume el estado actual de los candidatos vacunales más avanzados y discute los retos principales que ha tenido que enfrentar el desarrollo de una vacuna tetravalente contra el virus Dengue.

### EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

Se estima la ocurrencia de 50 a 100 millones de casos de FD por año en el mundo, 500 000 de los cuales resultan en FHD.<sup>7</sup> La FD está restringida principalmente a regiones tropicales y subtropicales, pero en los últimos 20 a 30 años, debido en parte al crecimiento poblacional, la urbanización y las migraciones, esta distribución se ha incrementado dramáticamente. Un estimado de 2 500 -3 000 millones de personas viven en áreas de riesgo, lo que significa un impacto económico similar al de otras enfermedades infecciosas como la malaria y la hepatitis.<sup>4,8</sup> La enfermedad es endémica en el continente americano, el sudeste asiático, el Pacífico occidental, África y el Mediterráneo oriental y se concentra fundamentalmente en las tres primeras regiones.

En las Américas, específicamente en Cuba, la FHD apareció por primera vez en 1981. Esta epidemia fue causada por cepas del genotipo asiático del serotipo 2 y produjo más de 300 000 enfermos, más de 10 000 casos de FHD y 158 fallecidos. Previamente, se había reportado en 1977 una epidemia de FD causada por el serotipo 1 que produjo más de 400 000 enfermos.<sup>9</sup>

En 1997, volvieron a reportarse casos de Dengue en Cuba, fundamentalmente en la provincia de Santiago de Cuba. Las infecciones se produjeron por una cepa del serotipo 2, la cual se relacionó, por análisis de secuencia nucleotídica, con cepas del genotipo de Jamaica, las cuales en los últimos años se han transmitido extensivamente por Latinoamérica y el Caribe.<sup>10</sup> Durante esta epidemia fueron considerados inicialmente 17 114 casos febriles como supuestos infectados, pero análisis serológicos realizados a 10 024 pacientes confirmaron la infección por Dengue de solo 2 946 personas. De ellos, 205 fueron diagnosticados con FHD/SCD y 12 fallecieron.<sup>11</sup>

En 2000 por primera vez en Cuba, se detectaron casos de FD provocados por la circulación de VD3 y VD4. Esto no constituyó una epidemia, ya que solamente se confirmaron 135 casos y ninguno de ellos como FHD. Sin embargo, a finales de 2001 y principios de 2002, se desató una gran epidemia ocasionada por el serotipo 3, con 14 443 casos en toda Cuba de los cuales 12 889 ocurrieron en Ciudad de La Habana. De ellos, 81 fueron clasificados como FHD y hubo tres fallecidos.<sup>12</sup>

### CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL VIRUS DENGUE

El VD es miembro del género *Flavivirus*, el cual en conjunto con los géneros *Pestivirus* y *Hepacivirus* comprende la familia *Flaviviridae*.<sup>13</sup> El género *Flavivirus* está compuesto por casi 80 miembros, incluyendo el

virus de la Fiebre Amarilla, el de la Encefalitis Japonesa, el del Oeste del Nilo y el de la Encefalitis Transmitida por Garrapatas.<sup>14</sup>

El virión maduro se caracteriza por tener una superficie lisa y esférica, con un diámetro aproximado de 500 Å. El genoma está encapsulado dentro de una nucleocápsida pobremente ordenada de 270 Å, compuesta por múltiples copias de la proteína de la cápsida (C).<sup>15</sup> Rodeando la cápsida se encuentra una bicapa lipídica de 40 Å de grosor derivada de la membrana del retículo endoplasmático (RE) de la célula hospedera, en la cual se encuentran ancladas las proteínas de la membrana (M) y la envoltura (E)<sup>14</sup> (Tabla 1). La composición de lípidos y carbohidratos de la envoltura viral varía en dependencia de las células del hospedero en las cuales el virus se ha replicado.<sup>16</sup>

El genoma consiste en una cadena simple de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva, con una longitud aproximada de 11 kb, el cual contiene una caperuza en el extremo 5' y no presenta cola de poliadenina en el extremo 3'. Este presenta un único marco de lectura ininterrumpido<sup>17</sup> flanqueado por regiones no codificadoras 3' y 5', las cuales se cree están involucradas en la replicación del ARN viral.<sup>18</sup>

El origen 5' del genoma codifica las proteínas estructurales de la C, la premembrana (prM), que es el precursor de la proteína de M madura y la E. Los genes para proteínas no estructurales (NS) están localizados en el resto del genoma. El orden de las proteínas codificadas por el genoma de los serotipos del VD es Cap5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'<sup>16</sup> (Tabla 1).

### MECANISMO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN

Una de las preguntas más importantes acerca de la patogénesis del Dengue es el mecanismo mediante el cual se une a las células blanco. La base del tropismo celular y tisular de los microorganismos, incluyendo los virus, está definida por la capacidad de determinadas moléculas de la superficie de unirse a receptores específicos de la superficie de las células blanco.<sup>19</sup> Las células blanco del VD en mamíferos son principalmente monocitos, macrófagos y células dendríticas.<sup>4</sup> El paso inicial de la infección viral es la unión del virión a la célula blanco, a través de la interacción de la proteína E con un receptor en la superficie de la célula hospedera.<sup>20</sup> Existen varios posibles receptores para el VD en diferentes tipos celulares. El receptor de lectina tipo-C DC-SIGN (CD209), se une a la proteína E de los cuatro serotipos del VD y media su entrada a la célula.<sup>21,22</sup> Sin embargo, recientes evidencias sugieren que DC-SIGN solo concentra el virus en la superficie celular y que es otro factor o coreceptor, todavía no identificado, el responsable de la internalización.<sup>23</sup> Se ha demostrado además, la necesidad de la presencia del glicosaminoglucano y heparán sulfato para que tenga lugar la infección eficiente de células de mamíferos.<sup>24,25</sup>

Posterior a la endocitosis, el genoma viral es liberado hacia el citoplasma de la célula hospedera a través de la fusión de la membrana viral y endosomal. Este paso es mediado por el péptido de fusión de la proteína E, la cual experimenta una reorganización estructural de homodímeros E:E a homotrímeros E:E:E desencadenada por la exposición a un pH ligeramente bajo, inferior a 6,5.<sup>26,27</sup> Este cambio induce al virus a adoptar una estructura más expandida, exponiendo el péptido de fusión, que provoca el acercamiento de las membranas celular y viral. La fusión de las membranas ocurre por un cambio estructural drástico de la proteína E.<sup>28</sup> La nucleocápsida es liberada al citoplasma en un proceso que no está completamente

**Tabla 1.** Características de las proteínas del virus Dengue.<sup>13-15,17</sup>

Proteínas	Peso molecular aproximado (kDa)	Función
Cápsida	11	Protección del ARN viral.
Membrana	8	Previene la fusión prematura de la proteína E.
Envoltura	50	Unión al receptor. Permite la fusión de las membranas viral y celular a pH bajo en los endosomas.
NS1	46	Participa en la replicación viral. Interviene en la maduración del virión.
NS2A	22	Involucrada en el bloqueo de la respuesta de IFN tipo 1 del hospedero. Participa en la replicación viral.
NS2B	14	Cofactor necesario para la actividad proteasa de NS3.
NS3	70	Actividad helicasa y proteasa. Probablemente involucrada en la modificación del extremo 5' del ARN viral.
NS4A	16	Participa en la replicación del ARN viral y en el bloqueo de la respuesta de IFN tipo 1 del hospedero.
NS4B	27	Localizada en las regiones de replicación del ARN viral. Participa en el bloqueo de la respuesta de IFN tipo 1 del hospedero.
NS5	104	Presenta actividad ARN polimerasa ARN dependiente. Involucrada en la metilación del ARN viral.

dilucidado. El desensamblaje de la nucleocápsida y la liberación del ARN viral al citoplasma ocurre, probablemente, de forma espontánea.<sup>29</sup>

Ocurrida la liberación del genoma viral, la región 5' no traducida (5'UTR) conduce al ARN hacia los ribosomas, donde ocurre la traducción del único marco de lectura.<sup>30</sup> La poliproteína resultante es procesada cotraduccional y postraduccionalmente para dar lugar a las 10 proteínas virales. La traducción temprana ocurre asociada al retículo endoplasmático rugoso (RER), siendo posible localizar las proteínas del virus en su contexto característico, ya sea luminal, en la membrana del RER o en el citoplasma.<sup>31</sup> El procesamiento de la poliproteína viral ocurre por la acción del complejo NS2B/NS3, una serina-proteasa de origen viral y proteasas de la célula hospedera como la peptidasa señal, proteasa tipo furina y otras desconocidas. El procesamiento proteolítico dentro del RE ocurre por las proteasas celulares, las cuales cortan las uniones entre las proteínas C y prM (C/prM), prM/E, E/NS1 y NS4A/B.<sup>32</sup> La proteasa NS2B/NS3 corta todas las uniones del lado citosólico de la membrana del RE.<sup>33,34</sup>

### Replicación viral

La replicación del genoma de los *Flavivirus* ocurre en el citoplasma, dentro de vesículas perinucleares membranosas provenientes del RE y Golgi.<sup>35,36</sup> La síntesis del ARN ocurre de forma asimétrica y semi-conservativa, donde inicialmente, es sintetizada una cadena de ARN de polaridad negativa a partir del ARN positivo del genoma viral para formar un ARN de doble cadena, conocido como forma replicativa. La forma replicativa es usada como molde para la síntesis de nuevas cadenas de ARN a través de un intermediario replicativo, en el cual pueden sintetizarse simultáneamente varias cadenas positivas a partir de una única cadena negativa. La síntesis de las cadenas positivas es 10 veces más eficiente que la de las cadenas negativas.<sup>35,37</sup> La síntesis del ARN es llevada a cabo por el complejo de replicación, el cual incorpora a la mayoría de las proteínas no estructurales virales, NS1, NS2A, NS3, NS4A y NS5, así como algunas proteínas del hospedero.<sup>38</sup> Las proteínas principales del

complejo de replicación son NS5, con actividad ARN polimerasa ARN dependiente; y NS3 que provee la actividad helicasa.<sup>17,39</sup>

Estudios de crioinmunomicroscopia electrónica indican que el ensamblaje de las partículas virales ocurre en el lumen del RER.<sup>40</sup> Se cree que la proteína C se une y recluta al genoma de los *Flavivirus*, generando un precursor de la nucleocápsida.<sup>41</sup> Los precursores de E y prM se localizan en la misma área y en conjunto promueven el proceso de ensamblaje.<sup>40</sup> Proteínas no estructurales como NS2A y NS3 también han sido implicadas en este proceso.<sup>42,43</sup>

Las vesículas con las partículas virales brotan del RER, probablemente estimulado por prM y transportan al virión inmaduro al aparato de Golgi.<sup>44</sup> La maduración del virión ocurre justo antes de la secreción en el trans Golgi, donde la proteasa de tipo furina es responsable del corte de prM a M.<sup>45</sup> Las partículas virales son acumuladas en vesículas intracitoplasmáticas hasta su liberación hacia el espacio extracelular.<sup>46</sup>

### FIEBRE HEMORRÁGICA DEL DENGUE. PATOGÉNESIS VS. INMUNOPATOGENESIS

#### Infecciones secundarias

El primer indicio de un fundamento inmunológico para la FHD fue la observación en los años sesentas, de que más del 85 % de los niños con FHD en Bangkok, Tailandia, tenían elevados títulos de Acs con reactividad cruzada contra el VD.<sup>47</sup> Lo anterior sugería que estos niños habían experimentado una infección previa con el virus y llevó a la hipótesis de que la FHD era más común en infecciones secundarias que en las primarias.

Varios estudios prospectivos realizados en Tailandia<sup>48,49</sup> y Myanmar<sup>50</sup> confirmaron esta hipótesis. Específicamente en Cuba, en la primera epidemia de VD ocurrida en 1977 no se reportaron casos de FHD y muchos de los infectados fueron asintomáticos. En 1981, aproximadamente, la mitad de los individuos de la población cubana analizados presentaban Acs anti-VD1 en el suero. Cuando ocurre la epidemia de FHD por VD2 en este mismo año, se pudo determinar que el 98 % de los que manifestaron

esta forma de la enfermedad presentaron una infección secundaria.<sup>11</sup> Diecisiete años más tarde, al ocurrir la epidemia de VD2 en Santiago de Cuba, se pudo observar que todos los casos graves de la enfermedad eran individuos mayores de 20 años de edad, contrario a lo que se había detectado en la epidemia anterior y en muchas reportadas en el sudeste asiático donde los niños habían sido los más afectados. Por otra parte y de manera similar a lo ocurrido en 1981, el 98 % de los casos de FHD se correspondieron con infecciones secundarias.<sup>51</sup>

En general, tomando en cuenta los datos epidemiológicos y los estudios realizados en las diferentes regiones afectadas por el VD, se puede concluir que las infecciones secundarias constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de la FHD, evidenciándose de esta forma un marcado carácter inmunopatogénico en este grado de la enfermedad.<sup>51</sup> Este fenómeno presupone un problema considerable en el diseño de un candidato vacunal tetravalente, y es por lo tanto imperativo, el conocimiento detallado de los mecanismos inmunopatogénicos que incrementan la severidad de la enfermedad.

### Factor viral

A pesar de lo explicado anteriormente sobre la relación de las infecciones secundarias y la FHD, esta forma severa de la enfermedad también se ha manifestado, aunque en menor medida, en pacientes con infección primaria por VD. Por otra parte, las formas más severas tienen lugar solo en una fracción relativamente pequeña de los individuos con infección secundaria.<sup>52</sup>

Aunque antes de 1981 ya circulaban varios serotipos del VD en América, no fue hasta ese año, durante una epidemia en Cuba, que ocurrieron los primeros casos de FHD en la región. Este hecho coincidió con la introducción de un nuevo genotipo del serotipo 2 del VD, proveniente del sudeste de Asia. Epidemias posteriores con FHD en Sudamérica también coincidieron con la presencia de cepas virales del sudeste de Asia.<sup>10</sup> Por el contrario, no se encontró evidencia de FHD en una epidemia causada en Perú por el VD2, cinco años después de la epidemia de VD1. En esa ocasión, se reportó incidencia de infección secundaria en el 60,5 % de los individuos analizados.<sup>53</sup> La ausencia de FHD en esta población fue atribuida al origen americano de la cepa viral que causó esta epidemia.<sup>54</sup> Estos y otros resultados sugieren un papel esencial a la virulencia en la patogénesis de la FHD/SCD.

Leitmeyer y cols.<sup>55</sup> reportaron la existencia de diferencias estructurales entre las cepas de origen asiático y americano del VD2 que están correlacionadas con la virulencia y la patogenicidad. Según su hipótesis, los determinantes principales de la severidad se encuentran en el aminoácido 390 de la proteína E que puede afectar la unión a la célula hospedera; los nucleótidos del 68 al 80 del lazo de la región 5' no codificadora, que podrían estar involucrados en la iniciación de la traducción y en los primeros 300 nucleótidos de la región no codificadora 3' que podrían regular la replicación viral mediante la formación de intermediarios. Relacionado con la cepa de genotipo americano que circuló en Perú y no provocó FHD, Colonia y Rico-Hesse<sup>56</sup> demostraron en experimentos *in vitro* que efectivamente esta cepa presentaba una capacidad disminuida de replicación viral con respecto a la del genotipo asiático.

### Factor racial

Existen evidencias epidemiológicas en Cuba que sugieren una mayor incidencia de casos de FHD/SCD

en individuos caucásicos con respecto a individuos de la raza negra.<sup>57</sup> Estas observaciones tienen un interés epidemiológico significativo debido a que las diferencias en la susceptibilidad a la FHD/SCD entre los diferentes grupos raciales en Cuba coincide con la reportada en África y poblaciones negras del Caribe.<sup>58,59</sup> Aunque el Dengue ha sido identificado en 19 países africanos existen solo reportes clínicos esporádicos, principalmente en poblaciones no indígenas.<sup>46,60,61</sup> La incidencia de FHD/SCD es además baja en países del Caribe donde los negros constituyen la mayoría de la población.<sup>58</sup>

Las observaciones epidemiológicas acerca del reducido riesgo de individuos negros de desencadenar FHD/SCD, comparado con individuos blancos en la población cubana, ha tenido escaso fundamento experimental. Sin embargo, se han publicado teorías que sugieren la existencia de genes humanos que modulan las manifestaciones clínicas en la infección por Dengue en individuos que son genéticamente africanos.<sup>62,63</sup> Consecuentemente, la presencia de genes africanos en Cuba y las poblaciones negras del Caribe podría estar determinando la baja incidencia de FHD en estos individuos.<sup>57</sup>

En 2006, Sierra y cols.<sup>64</sup> reportaron un estudio en el que examinaron la respuesta de células T de memoria de 80 individuos cubanos, pertenecientes a diferentes grupos étnicos, previamente infectados con VD1 y VD2 durante las epidemias de 1977 y 1981. Las personas blancas mostraron, en contraste con las negras, mayor proliferación de linfocitos de memoria T CD4<sup>+</sup> de reactividad cruzada, así como secreción de IFN- $\gamma$ . La variación observada en la respuesta de células T de los grupos étnicos estudiados podría estar relacionada con la inmunopatogénesis de la FHD, lo cual explicaría parcialmente las evidencias epidemiológicas ampliamente observadas.

### Carga viral

¿Inmunopatogénesis o patogénesis en la FHD? Responder esta pregunta ha llevado durante décadas a caminos separados dentro de la investigación de la enfermedad. No fue hasta 2000, que Vaughn y cols.<sup>65</sup> demostraron por primera vez una correlación directa entre la carga viral en sangre y la FHD, abriendo de esta forma la posibilidad de generalizar el fenómeno, creando una respuesta mucho más abarcadora al problema: la severidad de la enfermedad depende de la carga viral que se alcanza.

Posteriormente, Libraty y cols.<sup>66,67</sup> y Wang y cols.<sup>68</sup> también reportaron dicha correlación y demostraron además la presencia de un aumento de la carga viral en individuos con FHD con respecto a los de FD en la etapa de defervescencia.

El aumento de la carga viral en sangre puede explicarse por diferentes eventos moleculares no excluyentes entre sí, algunos de ellos debidos a eventos inmunopatogénicos y otros a la patogénesis viral.

### Amplificación dependiente de anticuerpos

En un estudio realizado en Bangkok en la década de los sesentas, se observó que el 85 % de los pacientes que sufrieron FHD tenían elevadas concentraciones de Acs contra otro serotipo del VD, presuntamente como consecuencia de una infección primaria.<sup>47</sup> Este hallazgo, ampliamente observado en epidemias de Dengue, ha sido atribuido al fenómeno conocido como amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), en el que Acs preexistentes contra una infección primaria presentan reactividad cruzada contra el virus causante de una segunda infección.<sup>69,70</sup> Se piensa que el mecanismo de

acción de la ADA involucra la formación de complejos del VD con Acs no neutralizantes preexistentes contra un serotipo heterólogo; estos complejos se unen, por la porción Fc de los Acs a los receptores Fc $\gamma$  en células como monocitos y macrófagos e inducen su internalización incrementando el número de células infectadas.<sup>71</sup>

Por otra parte, Gollins y Porterfield<sup>72</sup> observaron que el virus no parece entrar a las células a través de la unión al receptor Fc por sí solo, sino que se requiere además, la interacción con el receptor viral. De esta forma, el receptor Fc parece actuar como un co-receptor, incrementando la eficiencia de unión del virus y con esto, el número de células infectadas. Por lo tanto, la presencia de Acs con reactividad cruzada pudiera resultar en un aumento de la carga viral, disminuyendo el tiempo de incubación e incrementando la severidad de la enfermedad.<sup>73</sup>

Se ha observado además, que la infección por VD en presencia de Acs subneutralizantes promueve el aumento de la expresión de IL-6 y de IL-10. Por otra parte, disminuye la expresión de IL-12 y de IFN- $\gamma$ , así como la producción de óxido nítrico. Estos datos indican que la ADA induce preferentemente una respuesta de tipo Th-2 en monocitos.<sup>74</sup> Recientemente se demostró que el óxido nítrico inhibe la actividad de NS5, lo que trae consigo una disminución de la replicación viral *in vitro*.<sup>75,76</sup> Así, en una infección secundaria, la ADA inhibe los mecanismos de defensa intracelular tales como radicales libres y citocinas antivirales y aumenta la producción de citocinas inmunosupresoras, permitiendo el incremento de la replicación viral.<sup>74</sup>

Sin embargo, solo entre el 2 y el 4 % de los pacientes que experimentan una infección secundaria progresan a FHD,<sup>51</sup> indicando que otros factores pueden desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad. Además, no todos los casos de FHD resultan de infecciones secundarias.<sup>77,78</sup> Por lo tanto, la ADA no es ni suficiente, ni completamente necesaria para desencadenar FHD.<sup>79</sup>

### Respuesta celular de reactividad cruzada

Mientras las células T específicas pueden ser esenciales para la eliminación de muchas infecciones virales, también pueden contribuir a la progresión de la enfermedad a través del daño tisular.<sup>80,81</sup> El papel de los linfocitos T durante la infección por dengue no está completamente claro, pero estos pueden desempeñar un papel tanto en la eliminación del virus como en la inmunopatogénesis.<sup>82</sup>

La respuesta de células T obtenidas de monocitos de sangre periférica de pacientes infectados han mostrado que reconocen un rango de epítomos, predominantemente de las proteínas NS3, NS1, NS2A, NS5 y C.<sup>83-86</sup> Algunos estudios han indicado que estos clones de células T presentan amplia reactividad cruzada entre epítomos de los cuatro serotipos del VD.<sup>87,88</sup> Sin embargo, otros estudios indican que las afinidades de unión de estas células T con reactividad cruzada son significativamente débiles para otros serotipos virales.<sup>85,89</sup>

Zinvy y cols.<sup>85</sup> mencionaron por primera vez, el posible papel de los ligandos peptídicos alterados en el desarrollo de FHD. Según describen, un individuo infectado por primera vez es capaz de generar respuesta de linfocitos T de memoria (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) que puede ser parcialmente activada tras una segunda infección a través de un ligando peptídico alterado y no logra una lisis efectiva de las células infectadas por virus, liberando citocinas que incrementan la patogénesis de la enfermedad. En este reporte demostraron que existe una activación de las células T de reactividad cruzada en los casos de FHD, las que reconocen epítomos con diferencias de

pocos aminoácidos entre los serotipos del VD y sufren el proceso de apoptosis en el período de enfermedad aguda después de una activación. En dicho período demuestran que estos linfocitos no son capaces de proliferar ni de secretar IFN- $\gamma$ . El fenómeno de la activación preferencial de los linfocitos T de reactividad cruzada generados por la infección con el primer serotipo, cuyas afinidades por el segundo serotipo son bajas, se denomina *pecado antigénico original* (del inglés *original antigenic sin*) y ha sido descrito para otros virus.<sup>90</sup>

En 2003, Mongkolsapaya y cols.<sup>89</sup> propusieron que durante una infección secundaria, una proporción significativa de células T memoria específicas para el serotipo de la infección primaria, la cuales presentan bajas afinidades para antígenos de la infección secundaria, podrían desencadenar una respuesta inmune inadecuada. Estas células T de baja afinidad representan una expansión clonal de células memoria, con un mayor nivel y menor umbral de activación, y por lo tanto, responden más rápidamente que las células T vírgenes.<sup>91</sup> Durante un estudio a un paciente que portaba una infección con VD1 y que había sido previamente infectado por VD2, se observó que el 68 % de las células T presentaban reactividad cruzada entre VD1 y VD2, el 21 % reconocían preferentemente al virus de la primera infección (VD2) y solo el 11 % eran capaces de reaccionar específicamente contra el virus de la infección reciente (VD1).<sup>92</sup>

El estudio de Mongkolsapaya<sup>89</sup> confirmó la hipótesis planteada por Welsh y Selin,<sup>93</sup> la cual sugiere que células T de memoria específicas a antígenos previamente encontrados, pueden alterar el curso de infecciones posteriores. Estas alteraciones pueden resultar en: inmunidad protectora, inmunopatología o desviaciones inmunes (cambios en el equilibrio del patrón de células T cooperadoras tipo 1 y 2) o ambas.

Teniendo en cuenta que solamente una pequeña fracción de los individuos con infección secundaria desarrolla FHD, se ha tratado de encontrar una posible asociación entre la composición genética de los receptores de los linfocitos T y la incidencia de FHD. Estos estudios no han revelado resultados satisfactorios.<sup>94,95</sup> Por otra parte, se ha explorado la posible asociación de la forma aguda de la enfermedad a determinado HLA (del inglés, Human Leukocyte Antigen) dentro de las poblaciones susceptibles. Como resultado, en este caso, se han identificado los HLA asociados a FHD y a las formas menos severas de la enfermedad en dos regiones diferentes.<sup>96-98</sup>

Según lo anteriormente descrito, el conocimiento de estos factores, patogénicos e inmunopatogénicos, es importante para la comprensión de los mecanismos de protección frente a infecciones por vía natural.

### INMUNOPROTECCIÓN CONTRA EL VIRUS DENGUE

Uno de los estudios tempranos relacionados con la protección en VD lo reportó Sabin,<sup>99</sup> quien describió que al retar con VD2 a adultos voluntarios previamente infectados con VD1, estos estaban completamente protegidos. El intervalo entre las dos infecciones fue de dos meses. Paralelamente, también reportó que la infección por segunda vez con el serotipo heterólogo, 9 meses después de la infección primaria, provocaba una enfermedad con manifestaciones clínicas discretas y fiebre ligera. Sin embargo, 18 meses después de la infección primaria, cuando estos individuos se retaron con el virus homólogo, fueron completamente protegidos. No se realizaron estudios más allá de ese tiempo, por lo que no se conoce con certeza hasta qué punto una infección primaria puede ser protectora de por vida contra la in-

fección con el serotipo homólogo. Hasta el momento, se han encontrado concentraciones de Acs neutralizantes en personas inoculadas experimentalmente con el virus 40 años antes<sup>100</sup> y en individuos que habían vivido las epidemias de VD1 y VD2 en Atenas, en 1928,<sup>101</sup> o de VD1 en Osaka, en 1944<sup>102</sup>.

Una de las evidencias más fuertes sobre el papel de los Acs neutralizantes en la protección se obtiene de los datos epidemiológicos descritos por Halstead y cols.<sup>103</sup> En su estudio de tres años en Bangkok, Tailandia, reportaron que los índices de hospitalización por infección con VD entre los niños alcanzaron un máximo en aquellos con edades entre 7 y 8 meses de vida. Estos índices fueron de cuatro a ocho veces mayores que los observados entre los niños de 1 a 3 meses y dos veces mayores que los de los niños de 3 años. Kliks y cols.<sup>104</sup> determinaron la relación existente entre los títulos de Acs neutralizantes contra VD2 maternos y las edades de 13 niños con FHD provocada por infección con el virus homólogo. Los resultados permitieron concluir que los casos serios de infección con el virus ocurrieron cuando las concentraciones de Acs maternos habían disminuido considerablemente hasta alcanzar concentraciones subneutralizantes. Estos datos son consistentes con la hipótesis de que los Acs maternos desempeñan el doble papel de proteger al inicio y aumentar posteriormente el riesgo de desarrollar la FHD.

Además de los estudios de Sabin,<sup>99</sup> no se habían realizado estudios adicionales de reto en humanos para conocer con exactitud los mecanismos de protección. En estos últimos años, investigadores del Instituto de Investigaciones del Ejército de los Estados Unidos (Walter Reed)<sup>105</sup> han desarrollado cepas virales capaces de replicarse en humanos y exhibir una clínica moderada para estudios de reto en la prueba de candidatos vacunales. En el estudio de protección en humanos realizado a principios de 2003, en individuos vacunados con la formulación tetravalente de los virus atenuados desarrollados por ese mismo grupo, se pudo determinar que no existió una correlación total entre la respuesta neutralizante y la protección.

Aún quedan por definir qué sistemas de neutralización *in vitro* son los adecuados para medir este parámetro y correlacionar con la protección. Por otra parte, se desconoce el posible papel protector de la respuesta celular durante la infección por este virus.<sup>83</sup>

Tomando en cuenta lo descrito anteriormente, un candidato vacunal ideal contra VD debe ser aquel capaz de proteger contra los cuatro serotipos virales y a su vez, de no sensibilizar al individuo frente a una infección secundaria por el virus heterólogo.

## DESARROLLO DE VACUNAS

La vacunación constituye la vía más efectiva para la protección de grandes poblaciones contra las enfermedades infecciosas. Actualmente, se dispone de vacunas seguras y efectivas para la mayoría de los *Flavivirus* patogénicos, no siendo así para el VD. Muchas estrategias están actualmente en investigación con vistas al desarrollo de una vacuna efectiva y segura contra el VD. Una vacuna ideal contra el Dengue debería proveer inmunidad duradera contra la infección por cualquiera de los cuatro serotipos y ser bien tolerada. Además, debería ser adecuada para el uso en niños, proveer una respuesta inmune que no incremente el riesgo de desencadenar FHD por exposición subsiguiente al virus salvaje<sup>106</sup> y ser efectiva contra nuevas variantes del virus que puedan evadir la eficacia de la vacuna.

Se ha observado un gran progreso en el desarrollo de candidatos vacunales contra este virus, los cuales incluyen vacunas atenuadas por vía convencional, quiméricas, de ADN y recombinantes. En este sentido, las estrategias más avanzadas hasta el momento son las basadas en la generación de vacunas vivas atenuadas.<sup>107</sup>

## Vacunas vivas atenuadas

Idealmente una vacuna debería inducir inmunidad humoral (Acs neutralizantes) y celular (linfocitos citotóxicos). Las vacunas vivas atenuadas serían óptimas en este aspecto. Las cepas atenuadas tienen que ser capaces de replicarse suficientemente bien *in vivo* para provocar una respuesta inmune (idealmente contra los cuatro serotipos al mismo tiempo), pero a la vez, ser suficientemente restringida su replicación sistémica para evitar la generación de cualesquiera de los síntomas asociados al Dengue. Las cepas empleadas en vacunas vivas atenuadas necesitan ser además genéticamente estables. Más aún, estas cepas tienen que ser incapaces de transmitirse por mosquitos debido a que podrían facilitarse cambios evolutivos que reviertan la virulencia.<sup>106</sup>

A partir del descubrimiento en la década de los treinta de que pases repetidos en ratones o en cultivos de tejidos reducían la patogenicidad del virus de la Fiebre Amarilla, se desarrolló la vacuna 17D, la cual ha probado su seguridad y eficiencia durante varias décadas.<sup>108</sup> Utilizando técnicas similares a las empleadas para el desarrollo de una vacuna viva atenuada contra la Fiebre Amarilla, se han producido dos candidatos vacunales tetravalentes contra el VD.<sup>109</sup> Estas vacunas han sido desarrolladas usando virus atenuados por varios pases en células no humanas. Ambas han completado pruebas clínicas de seguridad en fase 2. Una de ellas fue desarrollada en la Universidad de Mahidol en Bangkok<sup>110</sup> y produce de 80 a 90 % de seroconversión en niños para los cuatro serotipos después de la administración de dos dosis. Sin embargo, los niveles de inmunidad inducidos para algunos de los serotipos pueden no ser suficientes para una protección duradera.

La otra vacuna, producida por Walter Reed Army Institute for Research<sup>111</sup> en los Estados Unidos produce niveles de seroconversión similares en adultos voluntarios, pero nuevamente se observaron bajos niveles de inmunidad para algunos serotipos. Como las bases moleculares de la atenuación no se conocen, se plantea que la interferencia de la replicación entre los serotipos o la interferencia en la estimulación inmune o ambas pueden generar una respuesta desbalanceada, resultando en una protección incompleta.<sup>112</sup> Además, se ha planteado que para cualquier vacuna atenuada de virus con genoma de ARN pudiera ocurrir reversión de la virulencia o recombinación *in vivo* entre los componentes de la vacuna o con el virus salvaje.<sup>109</sup>

Otra estrategia ha sido el empleo de clones de virus genéticamente modificados.<sup>113</sup> El mejor caracterizado de estos es el ChimeriVax-Dengue,<sup>115</sup> licenciado por Aventis-Pasteur (actualmente Sanofi-Pasteur), el cual usa el genoma del virus atenuado 17D, reemplazando los genes que codifican para las proteínas E y prM del virión de la Fiebre Amarilla por la del VD. Actualmente, se encuentra en estudio en animales experimentales y humanos voluntarios una vacuna tetravalente que contiene los cuatro virus quiméricos, cada uno con los genes de E y prM de uno de los cuatro serotipos del VD. Los resultados iniciales son promisorios y las pruebas de neurovirulencia sugieren que estos virus quiméricos pueden ser tan seguros como el 17D.<sup>116,117</sup> La formulación monovalente ChimeriVax-Dengue2 fue satisfactoria-

mente evaluada en humanos y demostró ser segura e inmunogénica. Sin embargo, la inmunización con la formulación tetravalente en primates indicó que las concentraciones de Acs neutralizantes para algunos serotipos fueron mucho menores que para otros, y animales individuales han mostrado diferencias marcadas en sus respuestas a cada uno de los cuatro serotipos.<sup>118</sup>

Los esfuerzos para la generación de una vacuna atenuada han tenido que enfrentar cuatro retos fundamentales: 1) el virus no se replica lo suficientemente bien como para formular un candidato económicamente viable; 2) no existe un modelo animal en el cual evaluar si el virus ha sido atenuado para el hombre; 3) elevado índice de reactividad; 4) una vacuna satisfactoria contra el VD debe ser tetravalente, por lo que es muy complejo controlar una respuesta equivalente contra los cuatro serotipos basados en niveles de replicación semejantes. Además, estas vacunas son muy lábiles a cambios de temperatura, pueden interferir en la inmunidad natural y la atenuación puede ser insuficiente. A todo esto se adiciona el riesgo de que al inmunizar la formulación tetravalente no exista seroconversión por neutralización a uno de los serotipos, posibilitando así que los Acs de reactividad cruzada generados contra el resto permitan la ADA tras una infección del serotipo homólogo al que indujo Acs deficientes. Un riesgo considerable resulta el hecho de que cepas atenuadas podrían dar lugar a la reversión a la virulencia luego de múltiples pases en humanos.

#### Vacunas de virus inactivado

Las vacunas inactivadas tienen dos grandes ventajas sobre las vivas atenuadas: seguridad, ya que no es posible revertir a un fenotipo más patogénico y la inducción de una respuesta inmunogénica balanceada, debido a que los cuatro serotipos en una vacuna multivalente de virus inactivado deberían ser igualmente inmunogénicos. Sin embargo, el uso de una vacuna de virus inactivado presenta sus propios retos: la vacuna solo contiene las proteínas estructurales del VD, y por lo tanto, no es capaz de inducir inmunidad contra proteínas no estructurales; se requiere de adyuvantes para generar una inmunogenicidad óptima, lo que aumenta la reactividad; es necesaria la administración de múltiples dosis para garantizar una protección duradera y resulta demasiado cara la producción de VD en cultivos de células, debido a la pobre replicación del virus. Estos retos hacen a las vacunas de virus inactivados candidatos menos atractivos para el empleo en áreas de epidemias, pero podrían ser útiles como primera inmunización en una estrategia con vacunas vivas atenuadas.<sup>119</sup>

#### Candidatos vacunales basados en la tecnología del ADN recombinante

Los avances en la tecnología del ADN, la química de las proteínas y la inmunología, proveen de novedosos métodos potenciales para el desarrollo de vacunas recombinantes. Estas tienen la ventaja de asegurar con anticipación bajos niveles de reactividad, debido a esto, las vacunas de proteínas recombinantes se encuentran libres de las restricciones impuestas para el uso de virus atenuados o inactivos.

#### Vacunas de ADN

Kochel y cols.<sup>120</sup> obtuvieron Acs neutralizantes en ratones inmunizados con una vacuna de ADN contra VD2. Utilizaron vectores plasmídicos de expresión en eucariota donde clonaron los genes de las proteínas prM y E truncada en el extremo C-terminal. Con este

candidato, también se obtuvo protección inmune en ratones.<sup>121</sup> En pruebas realizadas en monos con un candidato vacunal similar, pero que expresa las proteínas prM y E de VD1, se obtuvieron elevadas concentraciones de Acs neutralizantes.<sup>122,123</sup>

A pesar de los resultados obtenidos en ratones, las formulaciones de ADN ensayadas en monos indujeron protección parcial frente al reto viral, dicha protección se pierde cuando el reto ocurre siete meses después de la última inmunización.<sup>124</sup>

Imoto y Konishi<sup>125</sup> desarrollaron una vacuna tetravalente de ADN que induce Acs neutralizantes contra los cuatro serotipos del VD en ratones. La inmunogenicidad de la vacuna se incrementó cuando se administró en conjunto con VD2 o virus de la Encefalitis Japonesa inactivado. Otras vacunas tetravalentes de ADN han sido probadas recientemente con resultados alentadores, principalmente generación de anticuerpos neutralizantes y protectores.<sup>126,127</sup>

En general, las vacunas preventivas basadas en formulaciones de ADN tienen la limitación hasta el momento de su uso en individuos sanos, especialmente en niños. Todavía deben realizarse estudios más profundos que demuestren la seguridad de su uso de manera preventiva, debido a que existe el riesgo de que el ADN se integre al genoma celular, pudiendo desencadenar enfermedades autoinmunes o tolerancia inmunogénica.

#### Vacunas de proteínas recombinantes

Los antígenos del Dengue, principalmente la proteína E, han sido producidos en varios sistemas de expresión para generar candidatos vacunales basados en proteínas recombinantes. No es sorprendente que la mayoría de las preparaciones han generado de moderadas a elevadas concentraciones de Acs tras la inmunización en ratones. Aunque la principal ventaja de estas vacunas es que garantizan casi por completo elevados niveles de seguridad, no dejan de compartir muchas de las desventajas de las vacunas inactivadas. Hasta el momento, ningún candidato vacunal recombinante ha sido probado en humanos. Sin embargo, se han completado recientemente dos estudios en monos *rhesus* empleando formulaciones monovalentes de las proteínas E truncadas de los VD2 y VD4.<sup>119</sup> En un estudio de protección cruzada, Guzmán y cols.<sup>128</sup> inmunizaron monos verdes americanos con cuatro dosis de 100  $\mu$ g de proteína E del VD4, usando alúmina como adyuvante, obteniendo protección parcial ante el reto con VD2 salvaje. En colaboración con Hawai Biotech, Putnak y cols.<sup>129</sup> inmunizaron monos con dos dosis de una formulación de proteína E de VD2 expresada en células de *Drosophila* empleando una de cinco combinaciones diferentes de adyuvantes. Aunque los títulos de Acs neutralizantes antes del reto fueron muy variados, el grupo de monos que recibió la mayor dosis de antígeno combinada con dos adyuvantes se protegió completamente. Hawai Biotech está produciendo actualmente proteína E purificada por afinidad de cada uno de los cuatro serotipos y comenzará la fase I de ensayos clínicos.<sup>128</sup>

Otros sistemas de expresión como levaduras y *E.coli* han sido ampliamente usados para producir antígenos del VD, principalmente la proteína E. Un número creciente de evidencias, acumuladas en los últimos años por varios grupos,<sup>130-135</sup> han mostrado que muchas de las propiedades de la proteína E, importantes para el desarrollo de vacunas, están asociadas al dominio III (EDIII). Se ha comprobado además, que los candidatos vacunales que contienen este dominio son capaces de generar anticuerpos neutralizantes.<sup>136-138</sup>

Otro grupo de trabajo en el 2008 desarrolló una proteína de fusión formada por los EDIII de los cuatro serotipos virales, expresada en *Pichia pastoris*. La inmunización con dicha proteína tetravalente indujo la generación de anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos virales en ratones Balb/c.<sup>139</sup>

Recientemente, Bernardo y cols.<sup>140</sup> evaluaron una proteína de fusión recombinante que contiene el EDIII del VD1 unido por el extremo C terminal a la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*. Este grupo de trabajo demostró la capacidad inmunogénica y protectora de dicha proteína con adyuvante de Freund en *Macaca Fascicularis* y monos *rhesus*. Otra proteína de fusión que contiene dos copias del EDIII del VD4 unidas por los extremos C y N terminal a la proteína P64k, no generó anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, confirió protección parcial tras el reto intracraneal en ratones Balb/c.<sup>141</sup>

Lazo y cols.<sup>142</sup> evaluaron por primera vez la capacidad protectora en ratones de la proteína de la cápsida del VD2 obtenida de forma recombinante en *E.coli* con un 60 % de pureza. Después del reto intracraneal con dosis letales de virus del serotipo homólogo se obtuvo un 44 % de sobrevivencia. Estos niveles de protección fueron similares a los descritos por otros candidatos vacunales en el mismo modelo animal,<sup>143</sup> los cuales produjeron protección completa en monos retados con el virus homólogo infectivo.<sup>144</sup>

## CONCLUSIONES

Aunque el desarrollo de una vacuna contra el Dengue ha sido relativamente lento durante las décadas pasadas, el progreso en los últimos años ha alcanzado un ritmo sin precedentes. No obstante, el desarrollo de una vacuna efectiva y segura contra los cuatro serotipos continúa siendo un reto. El candidato ChimeriVax-Dengue, de Aventis-Pasteur (actualmente Sanofi-Pasteur) parece acercarse a las características óptimas según los resultados de estudios preclínicos, asimismo, los datos obtenidos en estudios clínicos son muy promisorios. Por otra parte, los candidatos recombinantes, aunque poseen elevados niveles de seguridad no han mostrado ser lo suficientemente inmunogénicos o protectores o ambos, se hace por lo tanto necesario el empleo de estrategias enfocadas a incrementar su inmunogenicidad y capacidad protectora como: diferentes combinaciones de antígenos y adyuvantes; conjugación con proteínas *carrier* y empleo de agregados y partículas antigénicas. El aumento de la incidencia y distribución del Dengue en las dos últimas décadas ha creado un impacto socio-económico de importancia mundial, por lo que la necesidad de una vacuna se hace cada vez más urgente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Halstead SB. Immune enhancement of viral infection. *Prog Allergy*. 1982;31:301-364.
- Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ and Vorndam AV. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Lancet*. 1998;352:971-977.
- Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:480-496.
- Kurane I and Takasaki T. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. *Rev Med Virol*. 2001;11:301-311.
- Kuo CH, Thai DI, Chang-Chieng CS, Lang CK, Chiou SS and Liao YF. Liver biochemical test and dengue fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;47:265-270.
- Almond J. *et al*. Accelerating the development and introduction of a dengue vaccine for poor children, 5-8 December 2001, Ho Chi Minh City, VietNam Vaccine. 2002;20:3043-3046.
- Gubler DJ and Kuno G. Viral pathogenesis of dengue infections. In *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Gubler DJ, Kuno G. (ed.) CAB International. 1997:273-275.
- Gubler DJ. Dengue fever/dengue hemorrhagic fever is now one of the most important public health problems in tropical developing countries and also has major economic and societal consequences. *Trends in Microbiology*. 2002;10:100-103.
- Cantelar N, Fernández A, Albert L and Pérez E. Circulación de Dengue en Cuba 1978-1979. *Rev Cub Med Trop*. 1981;33:72-78.
- Rico-Hesse R, Harrison LM and Salas RA. Origin of Dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997;230:244-251.
- Kouri G, Guzmán MG, Bravo J and Trina C. Dengue hemorrhagic fever/ dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic. *WHO Bulletin OMS*. 1989;67:375-380.
- Peláez O, Guzmán MG, Kouri G, Pérez R, San Martín JL, Vázquez S. *et al*. Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:719-722.
- Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich S, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L *et al*. *Flaviviridae* Intervirology. 1985;24:183-192.
- Linderbach D and Rice C. *Fields Virology*. Fields B.N. (ed.) New York, Raven Press, 991-1041, 2001.
- Kuhn RY, Zhang W, Rossman MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E *et al*. Structure of dengue virus: implications for *Flavivirus* organization, maturation, and fission. *Cell*. 2002;108:717-725.
- Chang GJ. Molecular biology of dengue viruses. In *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Gubler D.J. and Kuno G. (ed.) CAB International, London. UK: 1997:187-190.
- Rice CM, Aebersold R, Teplow DB, Pata J, Bell JR, Vorndam AV *et al*. Partial N-terminal amino acid sequences of three nonstructural proteins of two flaviviruses. *Virology*. 1986;151:1-9.
- Zeng L, Falgout B and Markoff L. Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3'-SL in the dengue type 2 virus genome required for replication. *J Virol*. 1998;72:7510-7522.
- Tyler KL, Squier MK, Broun AL, Pike B, Willws D, Oberhaus SM *et al*. Linkage between reovirus-induced apoptosis and inhibition of cellular DNA synthesis: role of the NS1 and M2 genes. *Virol*. 1996;70:7984-7991.
- Crill WD and Roehring JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol*. 2001;75:7769-7773.
- Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumppfeller C, Finke J, Sun EW *et al*. DC-SING (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;197:823-829.
- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL *et al*. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep*. 2003;4:723-728.
- Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL *et al*. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SING)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SING internalization signals. *J BIOL Chem*. 2005;280:23698-23708.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt R J *et al*. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*. 1997;3:866-871.
- Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao CL and King CC. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology*. 1999;257:156-167.
- Allison SL, Schlich K and Stiansy K. Oligomeric rearrangement of tick borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol*. 1995;69:695-700.
- Modis Y, Ogata S, Clements D and Harrison SC. Structure of dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004;427:313-319.



28. Modis Y, Ogata S, Clements D and Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Sci USA*. 2003;100:6986-6991.
29. Koschinski A, Wengler G and Repp H. The membrane proteins of flaviviruses form ion-permeable pores in the target membrane after fusion: identification of the pores and analysis of their possible role in virus infection. *J Gen Virol*. 2003;84:1711-1721.
30. Leysen P, De Clero E and Neyts J. Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13:67-82.
31. Rice CM. *Fields Virology*. Fields B.N. (ed.) New York: Raven Press: 1996;pp.391-960.
32. Ryan MD, Monaghan S and Flint M. Virus-encoded proteinases of the *Flaviviridae*. *J Gen Virol*. 1998;79:947-959.
33. Chambers TJ, McCourt DW and Rice CM. Production of yellow fever virus proteins in infected cells: identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology*. 1990;177:159-174.
34. Chambers TJ, Grakoui A and Rice CM. Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: a catalytically active NS3 protease domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. *J Virol*. 1991;65:6042-6050.
35. Chu PW and Westaway EG. Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology*. 1985;140:68-79.
36. Chu PW y Westaway EG. Characterization of Kunjin virus RNA-dependent RNA polymerase: reinitiation of synthesis *in vitro*. *Virology*. 1987;157:330-337.
37. Cleaves GR, Ryan TE and Schlesinger RW. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. *Virology*. 1981;111:73-83.
38. Mackenzie JM Khromykh AA, Jones MK and Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the *Flavivirus* Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*. 1998;245:203-215.
39. Li H, Clum S, You S, Ebner KE and Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol*. 1999;73:3108-3116.
40. Mackenzie JM and Westaway EG. Assembly and maturation of the *Flavivirus* Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. *J Virol*. 2001;75:10787-10799.
41. Khromykh AA and Westaway EG. RNA binding properties of core protein of the *Flavivirus* Kunjin. *Arch Virol*. 1996;141:685-699.
42. Kummerer BM and Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol*. 2002;76:4773-4784.
43. Liu WJ, Sedlak PL, Kondratieva N and Khromykh AA. Complementation analysis of the *Flavivirus* Kunjin NS3 and NS5 proteins defines the minimal regions essential for formation of a replication complex and shows a requirement of NS3 *in cis* for virus assembly. *J Virol*. 2002;76:10766-10775.
44. Martinez-Menarguez JA, Geuze HJ, Slot JW and Klumperman J. Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell*. 1999;98:81-90.
45. Stadler K, Allison SL, Schlich J and Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol*. 1997;71:8475-8481.
46. McBride WJ and Bielefeld-Ohmann H. Dengue viral infections: pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect*. 2000;2:10041-1050.
47. Halstead SB, Nimmannitya S and Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med*. 1970;42:311-328.
48. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V. *et al.* Risk for dengue shock syndrome: A prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am. J. Epidemiol*. 1984;120:653-669.
49. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE and Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38:172-180.
50. Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K. *et al.* Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;56:566-572.
51. Kourí G, Guzmán MG, Valdés L, Carbonel I, del Rosario D, Vázquez S *et al.* Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis*. 1998;4:89-92.
52. Guzmán MG and Kourí G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:33-42.
53. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vázquez B, Calampa C, Hayes CG *et al.* Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue hemorrhagic fever. *Lancet*. 1999;354:1431-1434.
54. Kliks S. Antibody-enhanced infection of monocytes as the pathogenic mechanism for severe dengue illness. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1990;6:993-998.
55. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, Ramos C *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*. 1999;73:4738-4747.
56. Cologna R and Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *Virology*. 2003;77:3929-3938.
57. Sierra BC, Kourí G and Guzmán MG. Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch. Virol*. 2007;152:533-542.
58. Benenson AS. *Control of Communicable Disease in Man*, 15th ed. Victor Graphics, Baltimore, MD, 1990.
59. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana P, Russell K, Sun S *et al.* Haiti: Absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am. J. Med. Hyg*. 2001;65:180-183.
60. World Health Organization. Prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever. WHO Regional Publication, SEARO No. 29, New Delhi, India:1999.
61. Zeller H G. Dengue, arbovirus and migrations in the Indian Ocean. *Bull Soc Pathol Exot*. 1998;91:56-60.
62. Rothman AL. Viral pathogenesis of dengue infections. In *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Gubler D.J. Kuno G. (eds.) New York, CAB International Press. 1997:245-273.
63. Rothman AL and Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology*. 1999;257:1-6.
64. Sierra BC, García G, Pérez AB, Morier L, Álvarez M, Kourí G. Ethnicity and Difference in Dengue Virus-Specific Memory T Cell Responses in Cuban Individuals. *Viral Immunol*. 2006;19:662-668.
65. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000;181:2-9.
66. Libraty DH, Endy TP, Houg HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S *et al.* Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue 3 virus infections. *J Infec Dis*. 2002;185:1213-1221.
67. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S *et al.* High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 2002;186:1165.
68. Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM *et al.* High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology*. 2003;305:330-338.
69. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ and Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J*. 2004;80:588-601.
70. Burke DS and Kliks S. Antibody-dependent enhancement in dengue virus infections. *J Infect Dis*. 2006;193:601-603.
71. Littau R, Kurane I and Ennis FA. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol*. 1990;144:3183-3186.

72. Gollins SW and Porterfield JS. A new mechanism for the neutralization of enveloped viruses by anti-viral antibody. *Nature*. 1986;321:244-246.
73. Cardosa MJ, Porterfield JS and Gordon S. Complement receptor mediates enhanced *Flavivirus* replication in macrophages. *Journal of Experimental Medicine*. 1983;158:258-263.
74. Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S and Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP1 cells. *Journal of General Virology*. 2007;88:365-375.
75. Charnsilpa W, Takhampunya R, Endy TP, Mammen MP, Libraty DH and Ubol S. Nitric oxide radicals suppress replication of wild-type dengue 2 viruses *in vitro*. *J Med Virol*. 2005;77:89-95.
76. Takhampunya R, Padmanabhan R and Ubol S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *J Gen Virol*. 2006;87:3003-3011.
77. Bravo JR, Guzman MG and Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81:816-820.
78. Wichmann O, Hongsiriwon S, Bowonwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y and Pukrittayakamee S. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand *Trop Med Int Health*. 2004;9:1022-1029.
79. Fink J, Gu F and Vasudevan SG. Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol*. 2006;16:263-275.
80. Cannon MJ, Openshaw PJ and Askonas BA. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp Med*. 1988;168:1163-1169.
81. Aichele P, Brduscha-Riem K, Oehen S, Odermatt B, Zinkernagel RM, Hengartner H *et al*. Peptide Antigen treatment of naive and virus-immune mice: Antigen-specific tolerance versus immunopathology. *Immunity*. 1997;6:519-529.
82. Gagnon SJ, Ennis FA and Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol*. 1999;73:3623-3629.
83. Kurane I, Brinton MA, Samson AL and Ennis FA. Dengue virus-specific, human CD4+ CD8- cytotoxic T cell clones: Multiple patterns of virus cross-reactivity recognised by NS3-specific T-cell clones. *J Virol*. 1991;65:1823-1828.
84. Brinton MA, Kurane I and Mathew A. Immune mediated and inherited defences against *Flaviviruses*. *Clin Diagn Virol*. 1998;10:129-139.
85. Zivny J, DeFronzo M, Jarry W, Jameson J, Cruz J, Ennis FA *et al*. Partial agonist effect influences the CTL response to a heterologous dengue virus serotype. *J Immunol*. 1999;163:2754-2760.
86. Rothman AL. Dengue: Defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest*. 2004;113:946-951.
87. Mathew A, Kurane I, Green S, Stephens HA, Vaughn DW, Kalayanarooj S *et al*. Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection. *J Virol*. 1998;2:099-4004.
88. Spaulding AC, Kurane I, Ennis FA and Rothman AL. Analysis of murine CD8(+) T-cell clones specific for Dengue virus NS3 protein: *Flavivirus* cross-reactivity and influence of infecting serotype. *J Virol*. 1999;3:39-403.
89. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaiskul N, Chairunsri A *et al*. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*. 2003;9:921-927.
90. Klennerman P and Zinkernagel RM. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte response to viruses bearing variant epitopes. *Nature*. 1998;394:482-485.
91. Veiga-Fernandez H, Walter U, Bourgeois C, McLean A and Rocha B. Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation *in vivo*. *Nat Immunol*. 2000;9:820-822.
92. Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A *et al*. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *The Journal of Immunology*. 2006;176:3821-3829.
93. Welsh RM and Selin LK. No one in naive: the significance of heterologous T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:417-426.
94. Okamoto Y, Gagnon SJ, Kurane I, Leporati AM and Ennis FA. Preferential usage of T-cell receptor V beta 17 by dengue virus specific human T lymphocytes in donor with immunity to denguevirus type 4. *J Virol*. 1994;68:7614-7619.
95. Gagnon SJ, Leporati A, Green S, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Stephens HAF *et al*. T cell receptor Vβ gene usage in Thai children with dengue virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;64:41-48.
96. Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, Schneider J, White NJ *et al*. HLA class I restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edge sword? *J Infect Dis*. 2001;184:1369-1373.
97. Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Gree S, Kalayanarooj S *et al*. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens*. 2002;60:309-318.
98. Zivna I, Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Stephens HA, Chandayingyong D *et al*. T cell responses to an HLA-B\*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. *J Immunol*. 2002;168:5959-5965.
99. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*. 1952;1:30-50.
100. Okuno Y, Fukunaga T, Tadano M, Fuki K, Ikeda T, Sekii K *et al*. Serological studies on volunteers inoculated experimentally with a dengue virus strain in 1943. *Biken Journal*. 1983;26:161-163.
101. Papaevangelou G and Halstead SB. Infections with two dengue viruses in Greece in the 20 th century. Did dengue hemorrhagic fever occur in the 1928 epidemic? *J Trop Med*. 1977;80:46-51.
102. Tadano M, Okuno Y, Fukunaga T and Fukai K. Retrospective serological studies on dengue epidemics in Osaka and Okinawa. *Biken Journal*. 1983;26:165-167.
103. Halstead SB, Scanlon JE, Umpaivit P and Udomsakdi S. Dengue and Chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. *Am J Trop Med Hyg*. 1969;18:997-1021.
104. Kliks SC, Nimmannitya S, Nisalak A and Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38:411-419.
105. Vaughn DW and Wellington S. Dengue virus: molecular basis of cell entry pathogenesis. *Viena, Austria*. 2003.
106. Guy B and Almond JW. Towards a dengue vaccine: Progress to date and remaining challenges. *Comparat Immunol Microbiol and Infect Dis*. 2007;31:239-252.
107. Stephenson JR. Developing vaccines against *Flavivirus* diseases: past success, present hopes and future challenges. *Novartis Foundation Symposium*. 2006;277:192-204.
108. Freestone DS, Ferris RD, Weinberg AL and Kelly A. Stabilised 17D strain yellow fever vaccine: dose response studies, clinical reactions and effect on hepatic function. *J Biol Standard*. 1977;5:181-186.
109. Halstead SB and Deen J. The future of dengue vaccines. *Lancet*. 2002;360:1243-1245.
110. Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P *et al*. Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two trivalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:99-109.
111. Sun W, Edelman R, Kanesa-Thanan N, Eckels KH, Putnak JR, King A D *et al*. Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;69:24-31.

112. Rothman AL. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv Vir Res.* 2003;60:397-419.
113. Durbin AP, Whitehead SS, McArthur J, Perreault JR, Blaney Jr JE, Thumar B *et al.* rDEN4delta30, a live attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate, is safe, immunogenic, and highly infectious in healthy adult volunteers. *J Infect Dis.* 2005;5:710-718.
114. Seligman SJ and Goild EA. Live *Flavivirus* vaccines: reasons of caution. *Lancet.* 2004;363:2073-2075.
115. Guirakhoo F, Kitchener S, Morrison D, Forrat R, McCarthy K, Nichols R *et al.* Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. *Hum Vaccin.* 2006;2:60-67.
116. Jacobs M and Young P. Dengue vaccines: preparing to roll back dengue. *Curropin Investig Drugs.* 2003;4:2399-2402.
117. Stephenson JR. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bull WH.* 2005;83:308-314.
118. Guirakhoo F, Pugachev K, Arroyo J, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R *et al.* Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. *Virology.* 2002;298:146-59.
119. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP and Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5:518-28.
120. Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K *et al.* Inoculation of plasmids expressing the dengue 2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine.* 1997;15:547-552.
121. Porter KP, Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Phillips I and Haye CG. Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol.* 1998;143:997-1003.
122. Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, Watts DM, Russell KL, Gonzalo AS *et al.* A dengue virus serotype 1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in *Aotus* monkeys. *Vaccine.* 2000;18:3166-3173.
123. Raviprakash K, Porter KR, Kochel TJ, Ewing D, Simmons M, Phillips I *et al.* Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in *rhesus macaques*. *J Gen Virol.* 2000;81:1659-1667.
124. Putnak R, Fuller J, VanderZanden L, Innis BL and Vaughn DW. Vaccination of *rhesus macaques* against dengue 2 virus with a plasmid DNA vaccine encoding the viral pre-membrane and envelope genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68:469-76.
125. Imoto J and Konishi E. Dengue tetravalent DNA vaccine increases its immunogenicity in mice when mixed with a dengue type 2 subunit vaccine or an inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Vaccine.* 2007;25:1076-1084.
126. Konishi E, Kosugi S and Imoto J. Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. *Vaccine.* 2006;24:2200-2207.
127. Mota J, Acosta M, Argotte R, Figueroa R, Méndez A and Ramos C. Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. *Vaccine.* 2005;23:3469-3476.
128. Guzman MG, Rodríguez R, Rodríguez R, Hermida L, Alvarez M, Lazo L *et al.* Induction of neutralizing antibodies and partial protection from viral challenge in *Macaca fascicularis* immunized with recombinant dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris*. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69:129-134.
129. Putnak R, Coller BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I *et al.* An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the *rhesus macaque* model. *Vaccine.* 2005;23:4442-4452.
136. Khanam S, Etemad B, Khanna N and Swaminathan S. Induction of neutralizing antibodies specific to dengue virus serotypes 2 and 4 by a bivalent antigen composed of linked envelope domains III of these two serotypes. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:266-277.
131. Khanam S, Khanna N and Swaminathan S. Induction of antibodies and T cell responses by dengue virus type 2 envelope domain III encoded by plasmid and adenoviral vectors. *Vaccine.* 2006;24:6513-6525.
132. Khanam S, Rajendra P, Khanna N and Swaminathan S. An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. *BMC Biotechnol.* 2007;7:10.
133. Hung JJ, Hsieh MT, Young MJ, Kao CL, King CC and Chang W. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol.* 2004;78:378-388.
134. Chin JFL, Chu JJH and Ng ML. The envelope glycoprotein domain III of dengue virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry. *Microbes Infect.* 2007;9:1-6.
135. Jaiswal S, Khanna N and Swaminathan S. High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type-2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*. *Protein Exp Purif.* 2004;33:80-91.
136. Zulueta A, Martín J, Hermida L, Alvarez M, Valdés I, Prado I *et al.* Amino acid changes in the recombinant dengue 3 envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. *Virus Res.* 2006;121:65-73.
137. Babu PJ, Pattnaik P, Gupta N, Shrivastava A, Khan M and Lakshmana Rao PV. Immunogenicity of a recombinant envelope domain III protein of dengue virus type-4 with various adjuvants in mice. *Vaccine.* 2008;26:4655-663.
138. Zhang ZS, Yan YS, Weng YW, Huang HL, Li SQ, He S *et al.* High-level expression of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein and induction of neutralizing antibodies in BALB/C mice. *J Virol Methods.* 2007;143:125-131.
139. Etemad B, Batra G, Raut R, Dahiya S, Khanam S, Swaminathan S *et al.* An Envelope Domain III-based Chimeric Antigen Produced in *Pichia pastoris* Elicits Neutralizing Antibodies Against All Four Dengue Virus Serotypes. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79:353-363.
140. Bernardo L, Izquierdo A, Alvarez M, Rosario D, Prado I, López C *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 1 envelope protein in non-human primates. *Antiviral Research.* 2008;80:194-199.
141. Lazo L, Zulueta A, Hermida L, Blanco A, Sánchez J, Valdés I *et al.* Dengue-4 envelope domain III fused twice within the meningococcal P64k protein carrier induces partial protection in mice. *Biotechnol Appl Biochem.*, 52, 00-00, 2009, doi:10.1042/BA20080074 (en prensa).
142. Lazo L, Hermida L, Zulueta A, Sanchez J, López C, Silva R *et al.* A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine.* 2007;25:1064-1070.
143. Hermida L, Rodríguez R, Lazo L, Silva R, Zulueta A, China G *et al.* A dengue-2 Envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice. *J Virol Methods.* 2004;115:41-49.
144. Hermida L, Bernardo L, Martín J, Alvarez M, Prado I, López C *et al.* A recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue-2 envelope protein is immunogenic and protective in nonhuman primates. *Vaccine.* 2006;24:3165-3171.