

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

***Evaluación inmunológica de proteínas recombinantes de
fusión de dengue 1 y dengue 2 en monos***

***Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor
en Ciencias de la Salud***

Autor: Lic. Lidice Bernardo Reyes, M.Sc.

Tutora: Prof. María G. Guzmán Tirado, Dr.Cs.

Asesora: Lic. Lisset Hermida Cruz, Dr.C.

Ciudad de La Habana, 2009

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ30: Deleción de 30 nucleótidos en el extremo 3' del genoma viral

Ac(s): Anticuerpo(s)

ADA: Amplificación dependiente de anticuerpos

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

ATCC: Colección americana de cultivos de células –del inglés- *American Type Culture Collection*

BHK-21: Células de riñón de Hamster recién nacido –del inglés- *baby hamster kidney cell*

BSA: Albúmina sérica bovina –del inglés- *Bovine seric albumin*

C: Cápsida

CDC: Centro para el control de enfermedades de los Estados Unidos -del inglés- *Control Disease Center*

Chimerivax DEN: candidato vacunal que contiene los genes PrM/E de los cuatros serotipos del virus DEN sobre la vacuna viva atenuada de fiebre amarilla

CRL: Cerebro de ratón lactante

DC-SIGN: Molécula de adhesión intracelular específica de células dendríticas -del inglés- *dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*

DEN: Dengue

DS: Desviación estándar

E: Envoltura

EJ: Encefalitis Japonesa

FA: Fiebre amarilla

FC: Factor citotóxico

FD: Fiebre del dengue

FHD: Fiebre hemorrágica por dengue

HLA: Antígenos de leucocitos humanos -del inglés- *human leucocyte antigen*

M: Membrana

MBP: Proteína de unión a maltosa de *Escherichia coli* -del inglés- *maltose binding protein*

NCR: Secuencias no codificadoras -del inglés- *non coding region*

NIH: Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos -del inglés- *Nacional Institute of Health*

NRNP: Técnica de neutralización por reducción del número de placas

NS: No estructural

Nt(s): Neutralizante(s)

P?: Pases desconocidos

PBS: Tampón fosfato

PBS-T: Tampón fosfato conteniendo Tween 20 a 0,05%

PC6/36HT: Pases en la línea celular C6/36 HT que proveniente de mosquitos *Aedes albopictus*

PD10: Proteína recombinante que contiene al dominio III de la proteína E del virus dengue 1 fusionado a la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*

PD5: Proteína recombinante que contiene al dominio III de la proteína E del virus dengue 2 fusionado a la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*

PDK: Cultivo primario de células de riñón de perro beagle -del inglés- *primary dog kidney*

PGMK: Cultivo primario de células de riñón de mono verde africano -del inglés- *primary green monkey kidney*

PM: Pases en mosquitos

PM?: Pases en mosquitos desconocidos

PR: Pases en ratón

PVero: Pases en la línea celular Vero que proviene de riñón de mono verde africano

RT-PCR: Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa -del inglés- *reverse-transcription polymerase chain reaction*

SC: Sobrenadante de cultivo

SCD: Síndrome de choque por dengue

SFBI: Suero fetal bovino inactivado

Th: Respuesta de células T cooperadoras -del inglés- *T helper*

TPG: Título promedio geométrico

TrpE: Proteína del metabolismo del triptófano de *E. coli*

ufp: unidades formadoras de placas

WRAIR: Instituto de investigaciones del ejército de Estados Unidos -del inglés- *Walter Reed Army Institute of Research*

SÍNTESIS

El desarrollo de subunidades recombinantes que contienen al dominio III de la proteína de la envoltura (E) de los virus del dengue (DEN) es una alternativa para el desarrollo de una vacuna segura contra esta entidad. En este trabajo caracterizamos la respuesta inmune inducida en monos por proteínas recombinantes de fusión de DEN 1 y DEN 2 que contienen al dominio III de la proteína E fusionado a la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*. Se demostró que la proteína recombinante P64k-dominio III de DEN 1 induce una respuesta inmune protectora en monos, similar a lo obtenido previamente para la proteína quimérica homóloga del serotipo 2 en este modelo. La proteína recombinante de DEN 1 (PD10) y la de DEN 2 (PD5) sensibilizaron al sistema inmune ante una dosis con el virus infectivo homólogo, lo que apoya el uso de estas proteínas recombinantes en estrategias de inmunización combinadas con cepas atenuadas, como una alternativa para revertir las principales desventajas de ambos enfoques. La respuesta de anticuerpos generada después de la inmunización con PD10 y PD5 en monos neutralizó a varias cepas del serotipo homólogo *in vitro*, y por tanto, las formulaciones basadas en este sitio podrían ser empleadas en áreas con circulación de varias variantes virales. Se confirmó también que los anticuerpos inducidos por PD10 y PD5 en monos se dirigen mayoritariamente al serotipo homólogo, lo que podría disminuir el riesgo de amplificación dependiente de anticuerpos después de la vacunación. Particularmente, los anticuerpos que se desarrollaron por la inmunización con el dominio III de DEN 1 disminuyeron la amplificación *in vitro* del virus DEN 2 en relación con los sueros de monos inoculados con el virus DEN 1 completo. Los resultados obtenidos en este trabajo avalan las potencialidades de las proteínas recombinantes de fusión P64k-dominio III de DEN 1 y DEN 2 como futuros candidatos vacunales.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. HIPÓTESIS	5
1.2. OBJETIVOS	5
1.2.1. <i>Objetivo General</i>	5
1.2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	5
1.3. NOVEDAD CIENTÍFICA	6
1.4. VALOR TEÓRICO.....	6
1.5. VALOR PRÁCTICO.....	6
2. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRUS DEL DENGUE.....	7
2.2. PROTEÍNA DE LA ENVOLTURA DEL VIRUS DENGUE	8
2.3. SEROTIPOS Y SUBTIPOS GENÉTICOS	8
2.4. REPLICACIÓN VIRAL.....	10
2.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD.....	11
2.6. SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA	13
2.7. EPIDEMIAS DE DENGUE EN CUBA	13
2.8. RESPUESTA INMUNE PROTECTORA CONTRA EL DENGUE DE ACUERDO A LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN MODELOS ANIMALES.....	14
2.9. RESPUESTA INMUNE PROTECTORA CONTRA EL DENGUE DE ACUERDO A LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN INDIVIDUOS INFECTADOS	15
2.10. PAPEL DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA EL DENGUE EN LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD	17
2.10.1. <i>Papel de los anticuerpos en la patogenia de la infección por dengue</i>	17
2.10.2. <i>Consecuencias de los factores virales en la patogenia de la enfermedad</i>	19
2.10.3. <i>Factores del hospedero relacionados a la patogenia de la infección por dengue</i>	21
2.10.4. <i>Papel de la respuesta celular en la patogenia de la infección secundaria por dengue</i>	21
2.10.5. <i>Papel de las citoquinas en la patogenia de la infección por dengue</i>	22
2.11. VACUNAS	23
2.11.1. <i>Candidatos vacunales vivos atenuados por vía convencional</i>	24
2.11.2. <i>Candidatos vacunales vivos atenuados por vía recombinante</i>	26
2.11.3. <i>Candidatos vacunales vivos recombinantes</i>	28
2.11.4. <i>Vacunas de subunidades recombinantes</i>	29
2.11.5. <i>Vacunas de virus inactivado</i>	33
2.11.6. <i>Vacunas de ADN</i>	34
2.11.7. <i>Estrategias de inmunización combinadas</i>	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES DE USO GENERAL	38
3.2. LÍNEAS CELULARES	39
3.2.1. <i>BHK-21</i>	39
3.2.2. <i>K562</i>	39
3.2.3. <i>Vero</i>	40
3.3. CEPAS VIRALES	40
3.3.1. <i>Cepas empleadas en la inoculación de los monos</i>	40
3.3.2. <i>Cepas empleadas en los ensayos inmuno-enzimáticos sobre fase sólida</i>	40
3.3.3. <i>Cepas empleadas en los ensayos de neutralización y de amplificación dependiente de anticuerpos</i>	41
3.4. PROTEÍNAS RECOMBINANTES EXPRESADAS EN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	42
3.4.1. <i>P64k</i>	42
3.4.2. <i>PD10</i>	42

3.4.3.	PD5.....	42
3.5.	ADYUVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	42
3.6.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	42
3.7.	ESQUEMAS DE INMUNIZACIÓN EN MONOS	43
3.7.1.	Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectora de la proteína PD10 en monos <i>M. fascicularis</i> y <i>M. mulatta</i>	43
3.7.2.	Esquema de inmunización con la proteína recombinante PD5 en monos <i>M. fascicularis</i>	44
3.7.3.	Infección de monos <i>M. fascicularis</i> con dos dosis del virus dengue 2.....	44
3.7.4.	Sueros humanos.....	44
3.8.	ENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS	45
3.8.1.	ELISA para la detección de los anticuerpos anti-P64k en los sueros de mono previo a la inmunización.....	45
3.8.2.	ELISA para la detección de los anticuerpos IgG totales anti-dengue en los sueros de mono o de humano.....	45
3.8.3.	Ensayo de neutralización por reducción del número de placas	46
3.8.4.	Ensayo de amplificación dependiente de anticuerpos.....	48
3.9.	DETECCIÓN DE LA VIREMIA EN LOS MONOS INOCULADOS CON EL VIRUS DENGUE	49
3.9.1.	Aislamiento viral en cultivo de células e identificación del virus.....	49
3.9.2.	RT-PCR.....	49
3.10.	DIAGRAMA DE TRABAJO.....	50
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1.	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA Y PROTECTORA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE DENGUE 1 EN MONOS <i>M. FASCICULARIS</i> Y <i>M. MULATTA</i>	51
4.2.	RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN LOS MONOS <i>M. FASCICULARIS</i> INMUNIZADOS CON LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PD10 Y PD5 TRAS EL RETO VIRAL HOMÓLOGO	64
4.3.	REACTIVIDAD CRUZADA DE LOS ANTICUERPOS INDUCIDOS POR LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS PD10 Y PD5 EN MONOS <i>M. FASCICULARIS</i> A LOS CUATRO SEROTIPOS Y A CEPAS DE LOS VIRUS HOMÓLOGOS	73
4.3.1.	Capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por PD10 y PD5 en monos frente a cepas de genotipos diferentes.....	73
4.3.2.	Reactividad cruzada de los anticuerpos IgG totales inducidos por PD10 y PD5 en monos a los cuatro serotipos del virus	78
4.4.	CAPACIDAD AMPLIFICADORA DE LOS SUEROS INMUNES A DENGUE 1 FRENTE A CEPAS DE DENGUE 2 DE LOS GENOTIPOS ASIÁTICO Y AMERICANO	81
5.	DISCUSIÓN GENERAL	88
6.	CONCLUSIONES	93
7.	RECOMENDACIONES	94
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	95
9.	BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS.....	118

1. INTRODUCCIÓN

El dengue es una enfermedad viral transmitida por vectores (mosquitos del género *Aedes*) causada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del mismo nombre (Burke y Monath, 2001). El dengue es endémico en gran parte de América y Asia y se estima que causa de 50-100 millones de infecciones anuales, de las cuales 500 000 resultan en casos de fiebre hemorrágica o del síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) (OMS, 2008). A pesar de los múltiples esfuerzos realizados por la comunidad científica internacional, aún no existe una vacuna licenciada contra el dengue y las medidas de prevención están dirigidas al control y a la erradicación del vector.

El desarrollo de un candidato vacunal contra los virus del dengue se ha visto limitado por varios factores. En primer lugar, es necesario desarrollar una vacuna tetravalente que induzca inmunidad protectora de larga duración contra los cuatro serotipos del virus de forma simultánea. La inmunidad deficiente contra uno de los serotipos del virus dengue puede constituir un factor de riesgo para el desarrollo de las formas severas de la enfermedad durante las infecciones por este serotipo que ocurran con posterioridad a la vacunación. La hipótesis más aceptada para explicar este fenómeno es la amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), que plantea el incremento de la multiplicación viral mediado por los anticuerpos heterotípicos no neutralizantes y los receptores para Fc de las células dianas (Halstead y Simasthien, 1970). Por tanto, la capacidad amplificadora de los anticuerpos inducidos por las formulaciones monovalentes frente a los serotipos heterólogos debe ser considerada en la evaluación de los candidatos vacunales contra el virus dengue. Por otra parte, no se cuenta con un modelo animal que

reproduzca adecuadamente los síntomas y signos de la enfermedad. Aún cuando los monos desarrollan una respuesta serológica similar a la de humanos, la viremia tiende a ser más moderada (Halstead y Palumbo, 1973; Guirakhoo y cols, 2000; Sariol y cols, 2007). Se plantea que los monos *Macaca mulatta* muestran los niveles de infección por dengue más cercanos a los observados en humanos, sin embargo, debido a su disponibilidad baja, otras especies como los *Macaca fascicularis* son también empleadas (Velzing y cols, 1999; Koraka y cols, 2007b). Una de las limitantes de la evaluación de los candidatos vacunales en monos es el número restringido de animales que son empleados en los diferentes estudios, lo que limita el alcance de los resultados obtenidos. Es de interés, por tanto, estudiar las posibles limitaciones del empleo de los monos *Macaca fascicularis* en comparación con los *Macaca mulatta* para la evaluación de los candidatos vacunales contra el virus dengue.

Además, los marcadores inmunológicos de protección para el virus dengue en los diferentes modelos animales y en el hombre no están totalmente esclarecidos. Los anticuerpos neutralizantes son considerados como el principal mecanismo de protección frente a la reinfección (Hombach y cols, 2007).

Las vacunas que se encuentran actualmente en fases más avanzadas de desarrollo están basadas en virus vivos atenuados, obtenidos por vía convencional mediante pases seriados en cultivos celulares o por vía recombinante (Hombach, 2007). Sin embargo, estos candidatos inducen reacciones adversas severas (entendidas como el desarrollo de los síntomas y signos de la enfermedad por dengue) después de la vacunación en humanos e interferencia entre los cuatro serotipos presentes en las formulaciones tetravalentes. Como una alternativa a los virus vivos atenuados se desarrollan candidatos vacunales de subunidades recombinantes, que constituyen una variante superior a los atenuados desde el punto de vista regulatorio. Las subunidades recombinantes del virus, al ser sistemas no replicativos, no es probable que induzcan los síntomas y signos de una infección por dengue después de la vacunación en humanos, no existe el riesgo de que sean transmitidos a los mosquitos y luego al hombre, ni de que reviertan al fenotipo virulento. Con el uso de una estrategia basada en sistemas no

replicativos se reduce también el riesgo de interferencia entre los cuatro componentes de las formulaciones tetravalentes, lo que asegura la inducción de una respuesta inmune balanceada contra los cuatro serotipos (Whitehead y cols, 2007).

El uso de subunidades recombinantes tiene la desventaja de que estas necesitan de adyuvantes para la inducción de una respuesta inmune óptima, lo que puede añadir toxicidad a las formulaciones finales. Además, la inmunización con proteínas recombinantes tiene una baja probabilidad de inducir una respuesta inmune celular y requiere de dosis de reactivación para mantener la respuesta inmune en el tiempo. Por estas últimas desventajas se pensó en el empleo de las proteínas recombinantes del virus dengue en estrategias de inmunización combinadas con vacunas vivas atenuadas. Sensibilizar al sistema inmune con proteínas recombinantes y luego reactivarlo con cepas atenuadas de dengue puede disminuir las reacciones adversas producidas en humanos por las cepas atenuadas y además inducir una respuesta humoral y celular duradera. Con este fin, las proteínas recombinantes del virus dengue desarrolladas como candidatos vacunales deben sensibilizar eficientemente el sistema inmune frente a la infección con el virus completo.

Dentro de la estructura del virus dengue, el dominio III de la proteína de la envoltura (E) se identificó como una región prometedora para el desarrollo de vacunas basadas en subunidades recombinantes. El dominio III se encuentra expuesto y accesible en la superficie del virión y contiene el sitio de unión del virus al receptor celular (Kuhn y cols, 2002). Además, este dominio presenta múltiples epitopos para anticuerpos neutralizantes específicos de tipo y subtipo (Megret y cols, 1992; Roehrig y cols, 1998; Crill y Roehrig, 2001) y especialmente, los anticuerpos neutralizantes más potentes descritos contra el virus dengue reconocen a este dominio (Crill y Roehrig, 2001). El dominio III tiene también un bajo potencial para la inducción de anticuerpos de reactividad cruzada contra los serotipos heterólogos (Simmons y cols, 1998), que pudieran mediar la ADA durante las infecciones siguientes a la vacunación. Además, la integridad antigénica y estructural de este dominio depende de un único puente disulfuro, lo

que facilita su obtención en sistemas de expresión procariota como *Escherichia coli* con el establecimiento de procesos de desarrollo fácilmente escalables y económicos.

El proyecto cubano para el desarrollo de una vacuna contra los virus del dengue, ejecutado en colaboración entre el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, desarrolla como una de sus estrategias la obtención de subunidades recombinantes que contienen al dominio III de la proteína E de cada uno de los cuatro serotipos, fusionado a la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*. La proteína P64k de *Neisseria meningitidis* es altamente inmunogénica y sus propiedades como proteína portadora (González y cols, 2000) y su seguridad (Perez y cols, 2001) se demostraron previamente en humanos. Hasta la fecha se demostró la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes correspondientes a los serotipos 1 y 2 en el modelo de ratón (Hermida y cols, 2004a; Hermida y cols, 2004b) y sólo de la proteína recombinante del serotipo 2 en monos *M. fascicularis* (Hermida y cols, 2006).

Con estos antecedentes, como continuación de la caracterización de la respuesta inmune generada por las proteínas recombinantes de fusión P64k-dominio III de los serotipo 1 y 2 en monos, en este documento nos propusimos la hipótesis siguiente:

1.1. Hipótesis

La proteína P64k-dominio III de dengue 1 induce una respuesta inmune funcional en monos contra el virus homólogo y reduce el riesgo de ADA frente al virus dengue 2. De la misma manera que la construcción similar del serotipo 2, sensibiliza al sistema inmune ante el reto viral y genera una respuesta de anticuerpos mayoritaria contra el serotipo homólogo que es neutralizante a varias cepas del mismo serotipo.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Caracterizar la respuesta inmune generada en monos por las proteínas recombinantes P64k-dominio III de los serotipo 1 (PD10) y 2 (PD5).

1.2.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la capacidad inmunogénica y protectora de la proteína PD10 frente al virus dengue 1 en dos especies de monos
2. Determinar la respuesta inmune humoral tras el reto viral de los monos inmunizados con las proteínas PD10 y PD5.
3. Determinar la reactividad cruzada de los anticuerpos inducidos por las proteínas quiméricas PD10 y PD5 en monos a los cuatro serotipos y a cepas de los virus homólogos.
4. Determinar la capacidad de ADA de los sueros de monos inmunizados con la proteína PD10 frente al virus dengue 2.

1.3. Novedad científica

Por primera vez a nivel mundial se demuestra que:

- Una proteína recombinante que contiene al dominio III de la proteína E del virus dengue 1 es inmunogénica y protectora en monos.
- La respuesta de anticuerpos inducida por una proteína recombinante que contiene al dominio III de la proteína E del virus dengue 1 reduce el riesgo de ADA frente a al virus dengue 2, en relación con la inmunización con el virus dengue 1.
- Las proteínas recombinantes de fusión que contienen al dominio III de la proteína E de los serotipos 1 y 2 sensibilizan al sistema inmune ante el reto viral.
- Las proteínas recombinantes que contienen al dominio III de la proteína E de los serotipos 1 y 2 generan una respuesta de anticuerpos neutralizante a varias cepas del mismo serotipo.

1.4. Valor teórico

- Extiende la credibilidad de las variantes de inmunógenos quiméricos que comprenden un fragmento de la proteína estructural del virus del dengue (dominio III), al demostrarse que tras su administración es posible evitar la propagación del virus en un modelo de monos y la sensibilización frente a la infección por un serotipo heterólogo.
- Los resultados incrementan el conocimiento acerca de la inmunogenicidad de la región del dominio III de la proteína de la envoltura del virus dengue en monos, al demostrarse que la respuesta de anticuerpos inducida se dirige mayoritariamente contra el serotipo homólogo y que a su vez neutraliza varias cepas dentro de un mismo serotipo.
- Los resultados presentados están recogidos en 4 publicaciones internacionales en revistas de impacto.

1.5. Valor práctico

- Se demuestra la utilidad de los monos *M. fascicularis* con respecto a los *M. mulatta* para la evaluación de las proteínas recombinantes P64k-dominio III.
- Se demuestran las potencialidades de las proteínas recombinantes de dengue 1 y dengue 2 como futuros candidatos vacunales contra el virus dengue.

2. REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características de los virus del dengue

Los virus del dengue (DEN) pertenecen al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Este género agrupa a aproximadamente 70 miembros, entre los que se encuentran el virus de la Fiebre Amarilla (FA) -virus prototipo- y el virus de la Encefalitis Japonesa (EJ) (Burke y Monath, 2001). El DEN es transmitido al hombre a través de la picada de la hembra del mosquito *Aedes aegypti* (Gubler y Clark, 1994). Este virus persiste en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión hombre-mosquito-hombre (McBride y Bielefeldt Ohmann, 2000).

Las partículas virales maduras son esféricas, presentan un diámetro entre 40 y 60 nm y contienen una nucleocápsida de 30 nm de diámetro rodeada por una bicapa lipídica de 10 nm de espesor. Esta bicapa proviene de la membrana de la célula hospedera y en ella están insertadas las proteínas de la envoltura y de la membrana, que forman proyecciones de 7 nm de longitud en la superficie del virión (Burke y Monath, 2001).

El genoma viral consiste de una molécula de ARN de simple cadena positiva, de aproximadamente 11 kb de longitud y 4,2 kDa de peso molecular, que posee en el extremo 5' una caperuza m⁷G5'ppp5'A y no presenta cola poliadenilada en el extremo 3' (Lindenbach y Rice, 2001). Contiene un solo marco de lectura que codifica para las tres proteínas estructurales: cápsida (C), envoltura (E) y membrana (M) (esta última se obtiene durante la maduración de la partícula viral a

partir del precursor denominado prM), y para siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Chambers y cols, 1990; Lindenbach y Rice, 2001). En los extremos 5' y 3' están presentes secuencias no codificadoras (NCR, -del inglés- *non coding region*) que dirigen los procesos de amplificación, de traducción y de empaquetamiento del genoma viral (Lindenbach y Rice, 2001; Lindenbach y Rice, 2003).

2.2. Proteína de la envoltura del virus dengue

La proteína E tiene un peso molecular de 53 a 54 kDa y se encuentra glicosilada en la mayoría de los virus de esta familia. Contiene aproximadamente 500 residuos aminoacídicos (Chambers y cols, 1990) y un dominio N-terminal anclado en la membrana. Presenta en su estructura 12 residuos aminoacídicos de cisteína que forman seis puentes disulfuros intramoleculares (Nowak y Wengler, 1987).

La cadena polipeptídica que conforma el fragmento soluble de la proteína E se ensambla en tres dominios: un dominio central en hoja plegada (dominio I), una región de dimerización elongada (dominio II) y una tercera región tipo inmunoglobulina (dominio III) que constituye el dominio carboxilo-terminal (aa 303-395) (Rey y cols, 1995; Rey, 2003). De acuerdo a la estructura del virión, el dominio III se encuentra expuesto (Kuhn y cols, 2002).

La proteína E desempeña un papel esencial en la unión a los receptores celulares, en la fusión a las membranas de las células y en el ensamblaje de los viriones, y constituye el determinante antigénico principal del virus del DEN (Rey y cols, 1995). Particularmente, el dominio III de la proteína E presenta epitopos inductores de anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo y en él se encuentra el sitio de unión al receptor celular (Rey y cols, 1995; Crill y Roehrig, 2001; Gromowski y Barrett, 2007).

2.3. Serotipos y subtipos genéticos

Los virus que conforman el complejo dengue existen como cuatro serotipos diferentes que están antigénicamente relacionados y que muestran una identidad de secuencia de un 70% aproximadamente (Henchal y cols, 1983). A través de los

estudios genómicos se identificaron varios genotipos dentro de un mismo serotipo viral.

Laille y cols (2004) estudiaron la secuencia del gen que codifica para la proteína E de 31 cepas de DEN 1 y demostraron la existencia de cinco genotipos para este serotipo con una diferencia del 6% en la secuencia estudiada. El genotipo I está asociado a cepas aisladas en Japón, Hawai y Asia, el genotipo II a cepas aisladas en Tailandia, el genotipo III a cepas selváticas de Malasia, el genotipo IV a cepas aisladas en el Sudeste de Asia, Pacífico Sur y Australia, y el genotipo V a cepas aisladas en América, África y el Sudeste de Asia (Laille y Roche, 2004).

Del virus DEN 2 se identificaron cuatro genotipos con un 6% de diferencia en la secuencia del genoma viral que codifica para la proteína E (1 485 nucleótidos). Estos se clasificaron como genotipo asiático (cepas aisladas en Tailandia, Nueva Guinea, Bolivia, Brasil, Colombia, México y Venezuela), americano (cepas aisladas en México, Venezuela, Trinidad y Perú), Malasia-India (cepas aisladas en Sri Lanka) y oeste africano (cepas aisladas en Guinea y Senegal) (Rico-Hesse, 2007). Para este mismo serotipo, Twiddy y cols (2002) describieron otra clasificación basada también en el análisis de la región del genoma viral que codifica para la glicoproteína E de la envoltura viral, que divide a las cepas de DEN 2 estudiadas en cinco genotipos con una diferencia promedio entre ellas de 7,3%. En este caso los genotipos se denominaron como selvático (cepas aisladas en África y Asia), asiático 1 (cepas aisladas en Tailandia y Malasia), asiático 2 (cepas aisladas en Filipinas, Taiwán, Viet Nam, China y en Sri Lanka), americano (cepas aisladas en Perú, Venezuela, en el Caribe y en el Pacífico Sur), asiático americano (cepas aisladas en China, Tailandia, Vietnam, Brasil, Venezuela y en el Caribe), y cosmopolita (cepas aisladas en África, Australia, en la India y en el Sudeste Asiático) (Twiddy y cols, 2002).

Del virus DEN 3 se reconocen cuatro genotipos de acuerdo al análisis de la región que codifica para las proteínas estructurales prM/M-E, con una diferencia en la secuencia nucleotídica de 6,5%. El genotipo I se corresponde con cepas aisladas en Indonesia, Malasia, Filipinas y en las Islas del Pacífico Sur, el genotipo II con cepas aisladas en Tailandia, el genotipo III con cepas aisladas en la India, Sri

Lanka, África y con la cepa aislada en Somoa en 1986 y el genotipo IV con cepas aisladas en Puerto Rico y con la cepa aislada en Tahití en 1965 (Lanciotti y cols, 1994).

Para el virus DEN 4 se identificaron sólo dos genotipos y las diferencias entre ellos en la secuencia que codifica para la proteína E son menores del 8%: el genotipo I para cepas aisladas en Filipinas, Tailandia y en Sri Lanka, y el genotipo II para cepas aisladas en Indonesia, en América Central y del Sur, en el Caribe y en el Pacífico Sur (Lanciotti y cols, 1997).

2.4. Replicación viral

Después de la inoculación del virus DEN en la piel a través de la picadura del mosquito *Aedes aegypti*, el virus se replica inicialmente en la células dendríticas con la subsiguiente diseminación sistémica y la infección de los macrófagos y los linfocitos (Marovich y cols, 2001; Kou y cols, 2008).

El virus DEN entra a las células hospederas por endocitosis medida por un receptor (Clyde y cols, 2006). Sin embargo, a pesar de que el sitio de unión viral se identificó ya en el dominio III de la proteína E (Rey y cols, 1995), el receptor celular es aún una incógnita. Se postula que la primera interacción del virus DEN tiene lugar con elementos de unión de baja afinidad presentes en la superficie celular, que tienen la función de concentrar el virus, para después ser transferido a un segundo receptor proteico capaz de internalizarlo. Entre los elementos identificados que interactúan con baja afinidad se encuentran el heparán sulfato, una lectina de tipo C (DC-SIGN -del inglés- *dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*) y un homólogo de DC-SIGN, el L-SIGN -del inglés- *lymph node specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin* (Lozach y cols, 2005). Entre los elementos que actúan con elevada afinidad se encuentran las proteínas de choque térmico, los proteoglicanos de heparán sulfato y el receptor de laminina de alta afinidad (Hilgard y Stockert, 2000; Moreno Altamirano y cols, 2002; Thepparit y Smith, 2004).

Después de la internalización del virus en la célula se forman las vesículas recubiertas de clatrina y posteriormente los endosomas. El pH ligeramente ácido

de los endosomas (inferior a 6,5) provoca un cambio conformacional irreversible en la proteína E, donde ésta se reasocia en trímeros para dar lugar a la exposición del dominio de fusión (Allison y cols, 1995) y a la posterior fusión entre el virus y la membrana del endosoma, que provoca la liberación de la nucleocápsida viral al citoplasma celular (Stiasny y cols, 1996). Inmediatamente después la proteína C se disocia del ARN viral y comienza su traducción en los ribosomas asociados al retículo endoplasmático rugoso (Heinz y cols, 1994; Clyde y Harris, 2006). La poliproteína resultante es procesada co y postraduccionalmente por proteasas de la célula (peptidasas señales) y del virus (complejo NS2B-NS3) para dar lugar a las 10 proteínas virales (Lindenbach y Rice, 2001).

Una vez sintetizado el complejo de replicación viral comienza la síntesis del ARN viral en las membranas de la región perinuclear. En este proceso el ARN (+) viral se transcribe en ARN (-) complementario, que sirve de molde para la obtención del genoma de la progenie viral (Westaway y cols, 1997; Westaway y cols, 1999; Lindenbach y Rice, 2003). Después de sucesivas rondas de transcripción y traducción comienza el ensamblaje de las partículas virales. Para ello el ARN viral se une a la proteína C y después pasa hacia el retículo endoplasmático rugoso, donde la nucleocápsida es envuelta en una bicapa lipídica que contiene a las proteínas prM y E como heterodímeros prM/E unidos de forma no covalente. Posteriormente, estas partículas son dirigidas hacia el retículo trans-Golgi donde el ambiente ácido favorece el clivaje del heterodímero prM/E por una proteasa del hospedero; como resultado se obtiene la proteína M a partir de la proteína prM y se libera la proteína E. Las partículas virales maduras son liberadas de las células mediante un proceso de exocitosis a través de vesículas secretorias (Zhang y cols, 2003).

2.5. Manifestaciones clínicas de la enfermedad

La infección provocada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del DEN puede cursar de forma asintomática, conllevar a una enfermedad benigna denominada fiebre del DEN (FD), u ocasionar la forma más severa conocida como

FHD/SCD, potencialmente fatal para quien la padece (Guzman y cols, 2000b; Endy y cols, 2002).

La mayoría de las infecciones por los virus del DEN son asintomáticas o sólo levemente sintomáticas (Endy y cols, 2002). La mayor parte de las infecciones sintomáticas desarrollan FD con un período de incubación que generalmente es de cuatro a siete días (Sabin, 1952). La FD se caracteriza por la presencia de fiebre alta de inicio abrupto, cefalea severa, dolor retro-orbital, mialgias, artralgias y rash. La fiebre entre 38 y 39 °C se mantiene de dos a siete días, desciende posteriormente y reaparece al tercer día. Las pruebas de laboratorio muestran neutropenia con linfocitosis, en ocasiones linfocitos atípicos y las enzimas hepáticas pueden elevarse de forma ligera (Sabin, 1952; Souza y cols, 2004). Aunque las manifestaciones hemorrágicas no son frecuentes, puede ocurrir sangramiento gingival, hematuria e hipermenorrea (Harris y cols, 2000).

Las manifestaciones clínicas de la FHD sin choque son semejantes a las de la FD. La FHD se caracteriza por fiebre, trombocitopenia, manifestaciones hemorrágicas y por el incremento de la permeabilidad vascular con extravasación de plasma (Carlos y cols, 2005). Las manifestaciones hemorrágicas de la FHD incluyen fragilidad capilar, petequias y sangramiento mucosal (Venkata Sai y cols, 2005). Un paciente es clasificado como caso de FHD cuando además de fiebre y hemorragia presenta trombocitopenia ($\leq 100\ 000$ plaquetas/mm³) y hemoconcentración (incremento del hematocrito $\geq 20\%$) (Nimmannitya, 1998; Srichaikul y Nimmannitya, 2000). En la FHD se pueden presentar trastornos neurológicos en los que se incluyen la irritabilidad, la depresión y la encefalitis (Solomon y cols, 2000).

En el SCD se produce un deterioro súbito del paciente luego de una fiebre de corta duración. La temperatura desciende y entre el tercero y el séptimo día aparecen los signos indicadores de insuficiencia del sistema circulatorio: la frialdad de la piel, la congestión, la cianosis peri-labial y la tensión arterial baja (Diaz y cols, 1988).

Aun cuando las cepas diferentes de los cuatro serotipos del virus muestran una capacidad variable para producir viremia en los pacientes de todas las edades, los títulos de viremia durante la fase febril de la enfermedad pueden ser altos (10^5 - 10^6 ufp/mL) e incluso pueden estar afectados otros órganos como el hígado (Jessie y cols, 2004). En los pacientes que desarrollan la FHD/SCD la viremia es generalmente de 10-100 veces mayor que en los de FD (Murgue y cols, 2000; Vaughn y cols, 2000; Libraty y cols, 2002; Wang y cols, 2003).

2.6. Situación epidemiológica

La FD y la FHD adquieren cada día una importancia mayor como problemas de salud que afectan a numerosos países de las zonas tropicales y subtropicales del planeta. La enfermedad es reconocida en más de 100 países y es endémica en África, el Mediterráneo Oriental, el Sudeste Asiático, el Pacífico Occidental y en América (Guzman y Kouri, 2003). Anualmente se reportan de 50 a 100 millones de casos de FD y de 250 000 a 500 000 enfermos de FHD/SCD (OMS, 2008).

2.7. Epidemias de dengue en Cuba

La primera epidemia de dengue en Cuba, después de la segunda mitad del siglo pasado, ocurrió entre los años 1977-1979 por el virus DEN 1. En esta epidemia se diagnosticaron más de 400 000 casos clasificados clínicamente como FD (Cantelar de Francisco y cols, 1981). En 1981 aparece en Cuba y por primera vez en América la FHD. Esta epidemia, provocada por el virus DEN 2, tuvo un total de 344 203 personas infectadas, de las cuales 10 312 desarrollaron FHD/SCD y fallecieron 158, de ellas 101 niños y 57 adultos (Kouri y cols, 1989).

En el período de 1986 hasta 1996 no hubo transmisión de DEN en el país. Desde principios y hasta mediados de 1997 se detecta nuevamente en nuestro país el virus DEN 2 en el municipio de Santiago de Cuba. Los análisis serológicos realizados a 10 024 pacientes confirmaron la infección de 3 012 personas, con 205 casos de FHD/SCD y 12 fallecidos (Kouri y cols, 1998). En el 98% de los casos graves y en el 92% de los fallecidos se comprobó la secuencia de infección DEN 1-DEN 2 (Guzman y cols, 2000b).

Un nuevo brote de DEN ocurrió en el año 2000 en la provincia de Ciudad de la Habana, donde se aislaron como causantes a los serotipos 3 y 4. En esta ocasión, se diagnosticaron sólo 138 casos de FD (Guzman y cols, 2003a). En el año 2001 se produce otra epidemia que tuvo al virus DEN 3 como agente etiológico, donde se diagnosticaron 14 443 personas infectadas, de las cuales 81 desarrollaron FHD y 3 fallecieron (Pelaez y cols, 2004).

Durante el período 2005-2008 se observó un acortamiento entre los brotes de DEN en diferentes regiones del país, los que se controlaron rápidamente.

2.8. Respuesta inmune protectora contra el dengue de acuerdo a los estudios realizados en modelos animales

Actualmente no existe un modelo animal que reproduzca los síntomas y signos de una infección por DEN, lo que limita el conocimiento acerca de los mecanismos protectores y patogénicos del virus. Dos modelos animales se emplean en los estudios de infección por los virus del DEN: los ratones y los monos.

Los ratones son el modelo animal más utilizado por razones prácticas de disponibilidad y costo. Sin embargo, su uso presenta varias limitaciones que ponen en duda la relevancia para humanos de la respuesta inmune inducida por los virus del DEN en este modelo. Las rutas de infección empleadas son fisiológicamente diferentes a las de la infección natural y la replicación del virus es extremadamente baja, aún cuando grandes cantidades de virus sean inoculadas. No obstante, la respuesta de anticuerpos inducida por el virus DEN en este modelo es similar a la observada en humanos (Halstead, 1974; Gil y cols, 2009). Asimismo, la respuesta de células T presenta el mismo patrón observado en la infección natural en humanos (Beaumier y cols, 2008).

La capacidad protectora de la respuesta inmune inducida por el virus DEN en ratones se evalúa a través de un modelo de encefalitis viral por DEN. Este modelo no reproduce las condiciones naturales puesto que la encefalitis por DEN en humanos es muy rara y, además, necesita de cepas neuroadaptadas que no son patogénicas para humanos (Sabin, 1952). Recientemente se demostró que la protección frente a la encefalitis en este modelo está asociada a la respuesta de

células T y no a la respuesta de anticuerpos neutralizantes (Gil y cols, 2009). Aunque el papel de las células T CD4 y CD8+ en la protección no está bien caracterizado, varios estudios asocian la respuesta inmune celular con la protección frente a la infección por DEN (Schlesinger y cols, 1987; Lobigs y cols, 1994; Wang y cols, 1999; Mazumder y cols, 2007; Yauch y cols, 2009). Recientemente, se identificaron péptidos dominantes de la proteína NS1 que son conservados entre los cuatro serotipos del virus y que pueden mediar la lisis eficiente de las células infectadas por las células T citotóxicas (Gao y cols, 2008).

El modelo de mono, es menos empleado en los estudios de inmunidad protectora por su disponibilidad baja y su costo elevado. Una gran cantidad de especies de monos son susceptibles a la infección por los virus del DEN entre los que se destacan *Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*, *Macaca fuscata*, *Cercopithecus aethiops*, *Erythrocebus patas*, *Papio cynocephalus*, *Cercocebus spp*, *Aotus spp*. La respuesta de anticuerpos (Halstead y Palumbo, 1973; Koraka y cols, 2007a) y la respuesta de células T anti-DEN también es similar a la observada en humanos (Koraka y cols, 2007a). Sin embargo, los mecanismos mediadores de la protección en monos no están bien caracterizados y, por tanto, los anticuerpos neutralizantes son considerados como el principal marcador de inmunidad protectora en este modelo (Halstead y Marchette, 2003).

De los modelos empleados para los estudios de inmunidad inducida por los diferentes candidatos, los monos constituyen el modelo de infección más cercano al humano. A diferencia del modelo de ratón, los monos desarrollan viremia después de la infección por DEN por lo que la protección en este modelo es medida de acuerdo a la reducción de la viremia después del reto viral (Yauch y Shresta, 2008). La eficacia de las formulaciones vacunales debe ser evaluada en monos antes de pasar a estudios clínicos en humanos.

2.9. Respuesta inmune protectora contra el dengue de acuerdo a los estudios realizados en individuos infectados

La respuesta inmune adaptativa contra el virus DEN tiene un papel crucial en la protección frente a la reinfección. Sin embargo, los mediadores exactos de esta

protección aún no están totalmente caracterizados. De acuerdo a los estudios realizados por Sabin (1952) se plantea que la infección por un serotipo del virus provee inmunidad protectora de larga duración contra el serotipo infectante y de corta duración contra el resto de los serotipos. En dicho estudio, al retar con virus DEN 2 a voluntarios adultos infectados dos meses antes con virus DEN 1 se observó protección total, mientras que la infección por el serotipo heterólogo nueve meses después de la infección primaria provocó manifestaciones clínicas leves. Sin embargo, cuando estos individuos se retaron con el virus homólogo a los 18 meses de la infección primaria aún resultaron protegidos totalmente (Sabin, 1952).

Los anticuerpos neutralizantes son considerados como el mecanismo protector más importante contra la infección por los virus del DEN (Hombach y cols, 2007), por lo que la inducción de niveles elevados de los mismos es el principal objetivo de los candidatos vacunales. Las principales evidencias al respecto se obtuvieron a partir de los estudios realizados en niños tailandeses nacidos de madres inmunes al virus, que resultaron protegidos frente a la infección por el DEN hasta los cinco meses de edad cuando aún persistían los anticuerpos neutralizantes transferidos a través de la placenta (Halstead y cols, 1969). Sin embargo, el papel de los anticuerpos neutralizantes en la protección puede variar para los diferentes serotipos (Hombach y cols, 2007). Un ejemplo de ello es el estudio prospectivo realizado también en niños tailandeses, donde la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus DEN 3 previo a la infección se asoció con el desarrollo de viremia baja y enfermedad ligera, mientras que la presencia de anticuerpos neutralizantes no se asoció con la protección frente al serotipo 2 (Endy y cols, 2004). Hasta el presente, no se conocen con exactitud los títulos de anticuerpos neutralizantes necesarios para proteger frente a la infección con cada uno de los serotipos, aunque se proponen valores entre 1/10 y 1/100 (Kliks y cols, 1988; Edelman y cols, 2003; Hombach y cols, 2007).

Los anticuerpos neutralizantes homotípicos pueden permanecer de por vida en los individuos luego de su infección. Tanto es así, que se detectaron niveles de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero colectadas 40 y hasta 60 años

después de la infección (Halstead, 1974; Papaevangelou y Halstead, 1977; Okuno y cols, 1983; Tadano y cols, 1983; Imrie y cols, 2007).

Además de la neutralización, los anticuerpos contra el virus DEN pueden participar en otros mecanismos protectores frente a la infección. En un estudio prospectivo realizado en niños tailandeses, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) detectada en los plasmas colectados previo a la enfermedad correlacionó inversamente con la carga viral durante la infección secundaria subsecuente por el virus DEN 3 (Laoprasopwattana y cols, 2007). También, la formación de inmunocomplejos entre la proteína E del virus DEN y los anticuerpos puede activar el complemento. Particularmente en los pacientes con FHD se demostró una disminución en actividad hemolítica del complemento durante la fase aguda de la infección (Nishioka, 1974), en comparación con los de FD en los que la actividad del complemento no se altera (Shaio y cols, 1992).

A pesar de que existen evidencias de la capacidad protectora de la respuesta inmune celular en los modelos animales, los datos obtenidos de individuos vacunados o naturalmente infectados con el virus DEN no muestran evidencias de que la respuesta celular pueda ser empleada como marcador de inmunidad protectora (Thomas y cols, 2009).

2.10. Papel de la respuesta inmune contra el dengue en la patogenia de la enfermedad

La respuesta inmune contra el virus DEN está implicada, además, en la patogenia de la FHD/SCD. En este sentido, existen varias hipótesis que tratan de explicar la participación de los diferentes elementos de la respuesta inmune en el incremento de la carga viral en sangre, descrito en los pacientes que desarrollan las formas severas de la enfermedad (Murgue y cols, 2000; Vaughn y cols, 2000; Libraty y cols, 2002; Wang y cols, 2003).

2.10.1. Papel de los anticuerpos en la patogenia de la infección por dengue

Los estudios seroepidemiológicos realizados en Tailandia mostraron que las infecciones secundarias por un serotipo diferente al que causó la infección primaria presentan un riesgo mayor de desarrollar la FHD. La enfermedad severa

ocurrió en niños de 2-8 años de edad, que desarrollaron una infección secundaria, y en niños de 7-8 meses de edad nacidos de madres inmunes al virus del DEN, en los que los anticuerpos maternos estaban ya en concentraciones subneutralizantes (Halstead y cols, 1969; Halstead y cols, 1970). Estas evidencias condujeron a la hipótesis de la amplificación dependiente de anticuerpos que postula que durante las infecciones secundarias, los anticuerpos desarrollados durante la infección primaria pueden reconocer de manera heterotípica al segundo serotipo infectante y formar complejos inmunes que faciliten la entrada del virus a las células susceptibles a través de los receptores celulares para Fc presentes en las células B, en las células dendríticas y en los monocitos-macrófagos, dianas de la infección por el virus DEN. El incremento de la replicación viral durante las infecciones secundarias heterotípicas desencadena procesos donde participa activamente el sistema monocito-macrófago, que concluyen en el aumento de la permeabilidad vascular responsable de los síntomas severos de la enfermedad (Halstead y Simasthien, 1970).

El estudio de los eventos que ocurren después de la infección del virus a las células facilitada por los anticuerpos, mostró que esta vía de infección modifica además los mecanismos antivirales intracelulares de la inmunidad innata y adaptativa (Chareonsirisuthigul y cols, 2007). La infección mediada por los anticuerpos suprime la producción de IL-12 e INF- γ , lo que conduce a una respuesta de células T cooperadoras tipo 2 (Th2 -del inglés- *T helper 2*), descrita en los pacientes con FHD (Chaturvedi y cols, 1999).

Las epidemias cubanas de FHD de los años 1981 y 1997 causadas por el virus DEN 2 aportaron datos que apoyan la hipótesis de la ADA, donde la gran mayoría de las infecciones severas se asociaron a casos de infección secundaria DEN 1-DEN 2 (Kouri y cols, 1989; Guzman y cols, 1990; Guzman y cols, 2000b).

Hasta los años recientes el fenómeno de la ADA se había asociado exclusivamente a los anticuerpos inducidos por la proteína E. Sin embargo, recientemente se demostró que los anticuerpos contra la proteína prM pueden mediar la ADA e incluso se evidenció una vía de amplificación independiente de

los receptores para Fc, mediada por la unión específica dual de los anticuerpos anti-prM a antígenos propios (como la proteína de choque térmico 60) y a la superficie del virión (Huang y cols, 2006). Además se demostró también la participación de las células dendríticas maduras en la ADA, en las que la amplificación correlacionó directamente con los niveles de expresión de los receptores para Fc e inversamente con la expresión de DC-SIGN (Boonnak y cols, 2008).

También se postula que la ADA puede ser inhibida por la acción del factor C1q del complemento de manera dependiente de las subclases de inmunoglobulinas. Particularmente aquellas subclases que se unen con mayor avidéz al factor C1q inducen bajos niveles de ADA (Mehlhop y cols, 2007).

2.10.2. Consecuencias de los factores virales en la patogenia de la enfermedad

Rosen (1977) planteó que la virulencia de las distintas cepas de los cuatro serotipos del virus del DEN puede aumentar cuando pasan repetidamente por el hospedero humano. De esta forma, las cepas más virulentas serían las responsables de las formas severas de la enfermedad. Una mutación en una región precisa del gen que codifica para la proteína E asegura la atenuación o el incremento de la virulencia de una cepa dada, por lo que la aparición de cuadros clínicos graves se asocia con determinadas cepas virales o mutantes de dichas cepas (Rosen, 1986).

2.10.2.1. Genotipos y secuencia de infección asociados a la patogenia de la infección por dengue

Los genotipos virales se relacionan con distintas presentaciones clínicas en humanos durante las infecciones secundarias. Las cepas de DEN 2 pertenecientes al genotipo asiático se asocian al desarrollo de epidemias de FHD, mientras que en las mismas condiciones las cepas de genotipo americano conducen al desarrollo de epidemias de FD (Leitmeyer y cols, 1999). Las epidemias de DEN 2 ocurridas en Cuba en 1981 y en Perú en 1995, causadas por cepas de los genotipos asiático y americano respectivamente, se precedieron por

epidemias de DEN 1. Sin embargo, mientras que en Cuba en 1981 se produjo una epidemia de FHD, en Perú en 1995 ocurrió una epidemia de FD (Kouri y cols, 1989; Kochel y cols, 2002). Se demostró que los sueros humanos inmunes a DEN 1, colectados tanto de individuos cubanos como peruanos, neutralizan más eficientemente al virus DEN 2 de genotipo americano que al de genotipo asiático (Kochel y cols, 2002; Guzman y cols, 2007). Además, ambos genotipos (asiático y americano) presentan diferencias estructurales que se correlacionan con su virulencia y su patogenicidad. Los determinantes genéticos de severidad se identificaron en el aminoácido 390 de la proteína E, que afecta la unión del virus a la célula hospedera, en los nucleótidos del 68 al 80 del lazo de la NCR 5', que están involucrados en la iniciación de la traducción del ARN viral, y en los primeros 300 nucleótidos de la NCR 3', que regulan la replicación viral mediante la formación de intermediarios (Leitmeyer y cols, 1999). También se demostró que las cepas de DEN 2 de genotipo americano muestran una capacidad replicativa menor en monocitos, en macrófagos y en células dendríticas humanas, comparadas con las cepas de genotipo asiático (Pryor y cols, 2001; Cologna y Rico-Hesse, 2003).

El desarrollo de las formas severas de la enfermedad durante las infecciones secundarias se relacionó, además, con determinadas secuencias de infección. Durante las epidemias cubanas, la infección secuencial DEN 1-DEN 2 o DEN 1-DEN 3 se asoció con epidemias de FHD (Kouri y cols, 1987; Guzman y cols, 2000b; Alvarez y cols, 2006), mientras que la secuencia de infección DEN 2-DEN 3 desarrolló cuadros ligeros en todos los casos (Alvarez y cols, 2006). Asimismo, en la epidemia de DEN 2 ocurrida en Tailandia en 1980, la secuencia de infección DEN 1-DEN 2 mostró un riesgo de desarrollo de FHD 500 veces mayor que cuando la infección primaria fue por el virus DEN 2. Para las secuencias de infección DEN 3-DEN 2 y DEN 4-DEN 2 el riesgo de desarrollo de la FHD fue 150 y 50 veces mayor, respectivamente, comparadas con las infecciones primarias (McBride y Bielefeldt Ohmann, 2000).

2.10.3. Factores del hospedero relacionados a la patogenia de la infección por dengue

Kourí y cols (1987) plantearon una hipótesis integral para explicar el desarrollo de las formas severas de la enfermedad en la que se incluyen factores de riesgo individual relacionados con la existencia de anticuerpos contra los virus del DEN, la edad, el sexo, la raza y las enfermedades crónicas como el asma, la diabetes y la siclemia; factores de riesgo epidemiológico relacionados con el vector (capacidad de ser transmisor y alta densidad), el intervalo entre ambas infecciones y la amplia circulación viral; y factores relacionados con el serotipo y la virulencia del agente. Esta hipótesis plantea que la presencia de los factores de riesgo individual en el contexto de los factores epidemiológicos y virales posibilita la ocurrencia de una epidemia de FHD/SCD (Kouri y cols, 1987).

En las epidemias cubanas el asma bronquial, el color de la piel blanca y la edad se asociaron con las formas severas de la enfermedad (Kouri y cols, 1989; Guzman y cols, 1999; Guzman y cols, 2002; Gonzalez y cols, 2005).

En varios estudios se relaciona también la genética del individuo con la protección o la susceptibilidad ante el desarrollo de la enfermedad por DEN, incluyendo el polimorfismo de los genes para los antígenos de leucocitos humanos (HLA –del inglés- *human leucocyte antigen*) (Sierra y cols, 2007; Soundravally y Hoti, 2007a; Soundravally y Hoti, 2007b; Soundravally y Hoti, 2008) y de otros genes no HLA (Loke y cols, 2002; Chaturvedi y cols, 2006a; Vejbaesya y cols, 2009).

2.10.4. Papel de la respuesta celular en la patogenia de la infección secundaria por dengue

Kurane y Ennis (1992) postularon la implicación de los linfocitos T en el desarrollo de la FHD durante las infecciones secundarias. La hipótesis plantea que tras la infección secundaria heterotípica se activan principalmente los clones de células T de memoria estimulados en respuesta a la infección primaria, los que generan la producción de una serie de citoquinas inflamatorias que participan en el desarrollo de la FHD/SCD (Rothman y Ennis, 1999). Más tarde se demostró que efectivamente las células T de reactividad cruzada activadas durante la infección secundaria reconocen epitopos con diferencias de pocos aminoácidos entre los

cuatro serotipos del DEN (los denominados APL -del inglés- *altered peptide ligands*) y que después de la activación sufren el proceso de apoptosis en el período agudo de la enfermedad. Estos linfocitos T de memoria no son capaces de proliferar ni de secretar INF- γ , por lo que se retarda la eliminación del virus y se incrementan los títulos virales (Mongkolsapaya y cols, 2003; Mongkolsapaya y cols, 2006; Dong y cols, 2007). Estos linfocitos T de memoria se detectaron hasta más de 20 años después de la infección primaria por DEN 1 o DEN 2 (Sierra y cols, 2002).

En ratones Balb/c infectados con diferentes secuencias del virus DEN también se demostró que después de la infección secundaria se amplifica la respuesta de células T comparada con la infección primaria, y que estas células T estimuladas son fundamentalmente linfocitos T de memoria inducidos durante la infección primaria (Beaumier y cols, 2008). Recientemente estos mismos autores demostraron que la respuesta de células T CD4+ de memoria altera la respuesta de células T CD8+ de memoria a la infección secundaria, lo que evidencia la interacción de las diferentes poblaciones celulares en la patogenia de la infección secundaria (Beaumier y Rothman, 2009).

2.10.5. Papel de las citoquinas en la patogenia de la infección por dengue

La liberación de citoquinas inflamatorias y de otros mediadores químicos está implicada en el incremento de la permeabilidad vascular en la FHD (Basu y Chaturvedi, 2008).

El cambio de una respuesta de citoquinas de células Th1 a una Th2 se observó en los casos de FHD (Chaturvedi y cols, 1999). La IL-12 tiene un efecto marcado en la diferenciación hacia células Th1, mientras que su ausencia cambia el balance hacia la producción de citoquinas de tipo Th2 (Gagnon y cols, 2002). En los pacientes con FD se detectaron niveles elevados de IL-12, mientras que en los de FHD estaba ausente (Pacsa y cols, 2000).

Las células T reguladoras también están implicadas en la severidad de la enfermedad (Chaturvedi y cols, 2007), lo que se corresponde con el incremento en

los niveles de IL-10 y de TGF- β observado en los pacientes con FHD (Agarwal y cols, 1999; Green y cols, 1999; Chen y cols, 2006b).

Por otra parte, se postula que los linfocitos T CD4⁺ secretan una única citoquina denominada factor citotóxico (FC) (Chaturvedi y cols, 1999), que induce a los macrófagos H2A⁺ a la producción de otra citoquina, el FC2. El complejo FC/FC2 induce a los macrófagos a producir radicales libres, nitrito, oxígeno reactivo y peroxinitrito que regulan directamente la expresión por parte de los macrófagos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-8 y TNF- α (Misra y cols, 1996a; Misra y cols, 1996b; Chaturvedi y cols, 2006b; Basu y Chaturvedi, 2008). La IL-8 se asoció con el incremento de la severidad de la enfermedad y con la muerte de los pacientes (Raghupathy y cols, 1998). La IL-8 promueve la activación de los neutrófilos (Huber y cols, 1991; Mul y cols, 2000), que una vez activados participan en el daño endotelial a través de la liberación de proteinasas como la elastasa (Chaturvedi y cols, 2006b). El TNF- α puede inducir directamente la muerte de las células endoteliales infectadas con el virus DEN y como consecuencia el daño endotelial y la hemorragia (Hober y cols, 1996; Chakravarti y Kumaria, 2006; Chaturvedi, 2006; Chen y cols, 2006a; Shresta y cols, 2006; Chen y cols, 2007a).

La IL-6 también se encontró en cantidades elevadas en los pacientes que desarrollan FHD/SCD (Chaturvedi y cols, 1999; Juffrie y cols, 2001; Chen y cols, 2006b) y se demostró que ésta puede incrementar la permeabilidad de las células endoteliales (Nguyen y cols, 2004; Lin y cols, 2005; Shi y cols, 2006). Las células dendríticas maduras que median la ADA secretan cantidades elevadas de IL-6 y de TNF- α (Boonnak y cols, 2008).

2.11. Vacunas

En la actualidad no existe una vacuna disponible contra los virus del DEN. La obtención de una formulación vacunal está limitada por la existencia de cuatro serotipos, el fenómeno de la ADA, la ausencia de un modelo animal que reproduzca adecuadamente la enfermedad, y el poco conocimiento que se tiene de la etiopatogenia de la misma. Los principales retos para el desarrollo de una vacuna son: (1) inducir inmunidad protectora de larga duración contra los cuatro

serotipos del virus y (2) no sensibilizar al individuo frente a una infección secundaria por un virus heterólogo (Hombach, 2007; Whitehead y cols, 2007).

2.11.1. Candidatos vacunales vivos atenuados por vía convencional

Los candidatos vacunales vivos atenuados pueden mimetizar la infección natural por el virus a través de la inducción de una respuesta humoral y celular durable. La replicación de estos candidatos debe ser baja para evitar el desarrollo de la enfermedad, donde los síntomas tales como cefalea, fiebre y artralgia no son aceptados. Asimismo, los cuatro componentes de la formulación deben replicarse lo suficiente como para inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes balanceada contra los cuatro serotipos. Por tanto, estas estrategias tienen el reto de lograr un balance entre inmunogenicidad y reactogenicidad. Es importante, además, que se conozcan las bases genéticas de la atenuación de los virus para monitorear la estabilidad genética de estos durante las fases de evaluación y desarrollo (Whitehead y cols, 2007).

Hasta el momento existen dos candidatos vivos atenuados obtenidos por la vía convencional mediante pases seriados en cultivos celulares, que se formularon como vacunas tetravalentes y se evaluaron en estudios de fase clínica. El primero de ellos lo desarrollan científicos de la Universidad de Mahidol, Tailandia, e incluye cepas de los serotipos 1, 2 y 4 atenuadas en cultivos primarios de células de riñón de perro beagle (PDK, -del inglés- *primary dog kidney*); mientras que la del virus DEN 3 se obtuvo en cultivo primario de células de riñón de mono verde africano (PGMK –del inglés- *primary green monkey kidney*). Estos candidatos se evaluaron en voluntarios tailandeses como formulaciones mono, bi, tri y tetravalentes, en los que los anticuerpos neutralizantes se detectaron hasta dos años después de la vacunación (Bhamarapavati y Sutee, 2000). A partir de estos estudios y de la reformulación del virus DEN 3, que interfería con el resto de los componentes, se escogió una variante tetravalente para ser estudiada en 105 niños tailandeses no inmunes a DEN en un esquema de tres dosis. Después de la primera dosis la reactogenicidad fue moderada, sin embargo, el 5% de los niños tuvieron reacciones sistémicas considerables. Una vez administrada la tercera dosis del

esquema se obtuvo una seroconversión tetravalente entre el 85% y el 100% dependiendo de la formulación (Sabchareon y cols, 2004). No obstante, el virus DEN 3 estaba aún poco atenuado por lo que después de un intento de atenuación mediante purificación por placas se realizó una nueva evaluación para este serotipo en individuos adultos no inmunes a DEN, que reveló una reactividad elevada (Sanchez y cols, 2006). Por esta causa se cerraron los estudios con este candidato vacunal. Recientemente se corroboró que los clones infecciosos de la cepa atenuada de DEN 2 (PDK 53) inducen anticuerpos neutralizantes y la expresión de los genes de las citoquinas *in vitro* (Rababert y Yoksan, 2009).

El instituto de investigaciones del ejército de Estados Unidos (WRAIR –del inglés- *Walter Reed Army Institute of Research*) desarrolla una formulación similar a la anterior, con la diferencia de que los virus además de haber sido atenuados en PDK, son producidos en células fetales de pulmón de monos *rhesus*. Los estudios en humanos mostraron que los serotipos 2, 3 y 4 eran sólo medianamente reactivos, mientras que el candidato de DEN 1 inducía fiebre y rash en el 40% de los vacunados. Después de una dosis de las formulaciones monovalentes, entre el 46-100% de los individuos vacunados seroconvirtieron para cada uno de los serotipos, con la mayor tasa de seroconversión para DEN 1. La baja atenuación del serotipo 1 fue también evidente durante la evaluación de la formulación tetravalente, donde además el virus DEN 4 resultó sobre atenuado (Edelman y cols, 2003; Sun y cols, 2003). Como solución para mejorar la inmunogenicidad, el componente del serotipo 1 se sustituyó por una cepa con un número de pases superior a la anterior (del pase PDK 20 por el PDK 27), mientras que el del serotipo 4 se reemplazó por una cepa con menos número de pases (del pase PDK 20 por el PDK 6). Esta formulación vacunal tetravalente se evaluó en un estudio de fase clínica en niños tailandeses de seis a siete años. La vacuna resultó bien tolerada sin la inducción de efectos adversos serios, aunque uno de los voluntarios experimentó fiebre y viremia asociada al serotipo 4. Después de la segunda dosis seis de los siete voluntarios desarrollaron una respuesta de anticuerpos neutralizantes tetravalente, la que se mantuvo en cinco de ellos hasta diez semanas después de la segunda dosis (Simasathien y cols, 2008). Los

resultados del estudio de fase clínica II en 71 individuos adultos mostró seroconversión tetravalente sólo en el 73% de los casos después de la administración de dos dosis, para la mejor de las tres variantes ensayadas (Sun y cols, 2009). Esta estrategia constituye el candidato vacunal en desarrollo más avanzado actualmente. No obstante, aún en el estudio de fase clínica 2 no se logró seroconversión tetravalente en todos los casos después de dos dosis y se observaron reacciones adversas (Sun y cols, 2009), por lo que el balance entre inmunogenicidad y reactogenicidad continúa como un reto para esta formulación. Estas estrategias atenuadas presentan también la limitante de que no se conocen aún las mutaciones que determinan la atenuación de las cepas (Mahidol y WRAIR), con la excepción de la cepa atenuada de DEN 2 obtenida en la Universidad de Mahidol (PDK 53) (Butrapet y cols, 2000).

2.11.2. Candidatos vacunales vivos atenuados por vía recombinante

Los candidatos atenuados por vía molecular se desarrollan siguiendo dos estrategias principales: (1) la atenuación mediante la introducción de mutaciones seleccionadas y (2) la inserción de los genes estructurales (prM/E) en el esqueleto de una cepa de DEN atenuada por vía convencional (Hombach, 2007).

Las estrategias de atenuación molecular de las cepas de DEN están limitadas por la poca información que se tiene sobre las bases moleculares y sobre los determinantes de virulencia que pueden ser dianas de la atenuación. Por tanto, las atenuaciones moleculares se dirigen principalmente hacia los extremos no codificadores que se postula están implicados en la replicación viral. Con este enfoque, los investigadores del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH –del inglés- *Nacional Institute of Health*) desarrollaron candidatos atenuados de los serotipos 1 y 4 mediante la introducción de una deleción de 30 nucleótidos en el extremo 3' del genoma (3' 172-143) (DEN 1 Δ 30 y DEN 4 Δ 30) (Men y cols, 1996; Whitehead y cols, 2003a). Ambos candidatos (DEN 1 Δ 30 y DEN 4 Δ 30) resultaron seguros e indujeron un balance entre el nivel de atenuación y la inmunogenicidad en monos y humanos (Durbin y cols, 2001; Blaney y cols, 2004a; Blaney y cols, 2004b; Durbin y cols, 2005; Durbin y cols, 2006a; McArthur y cols,

2008). Sin embargo, debido a que los candidatos similares de DEN 2 y DEN 3 (DEN 2 Δ 30 y DEN 3 Δ 30) no mostraron tal balance entre inmunogenicidad y atenuación, decidieron realizar virus quiméricos para estos serotipos incluyendo los genes prM/E de los serotipos 1 y 3 sobre el esqueleto atenuado de la cepa DEN 4 Δ 30 (DEN 2/4 Δ 30 y DEN 3/4 Δ 30), los que resultaron altamente atenuados en monos (Whitehead y cols, 2003b; Blaney y cols, 2004a). Los candidatos DEN 2/4 Δ 30 y DEN 3/4 Δ 30 se combinaron con DEN 1 Δ 30 y DEN 4 Δ 30 en una formulación tetravalente que resultó altamente inmunogénica y protectora en monos (Blaney y cols, 2005). El candidato DEN 2/4 Δ 30 se evaluó en humanos donde también mostró una seguridad e inmunogenicidad alta a la dosis de 10^3 unidades formadoras de placas (ufp) (Durbin y cols, 2006b). Los estudios en humanos de la variante DEN 3/4 Δ 30 están en curso actualmente y aún se debe evaluar la factibilidad de esta formulación tetravalente para humanos. Debido a que el candidato DEN 3/4 Δ 30 puede resultar más o menos atenuado de lo deseado para humanos, anticipadamente se desarrollaron nuevas construcciones que contienen al virus DEN 3 completo con mutaciones adicionales al Δ 30 en el extremo 3', o con la sustitución del extremo 3' por el del DEN 4 Δ 30 o DEN 4. La evaluación de estos nuevos virus quiméricos en monos mostró un 100% de seroconversión y protección frente al reto viral, por lo que de fallar la evaluación del DEN 3/4 Δ 30 en humanos se emplearía uno de estos candidatos que contienen al virus DEN 3 completo para la primera formulación tetravalente (Blaney y cols, 2008).

Los investigadores del Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC -del inglés- *Control Disease Center*) desarrollaron otro candidato quimérico tetravalente mediante la sustitución de los genes prM/E de los serotipos 1, 3 y 4 sobre el esqueleto de la cepa atenuada de DEN 2 obtenida en la Universidad de Mahidol (DEN 2 PDK 53), tomando en consideración que las tres mutaciones que la atenúan se encuentran fuera de los genes estructurales (Huang y cols, 2003). Las formulaciones mono y tetravalentes se evaluaron hasta el momento en monos donde, a pesar de inducir una inmunogenicidad adecuada y

una viremia baja, se observó interferencia entre los cuatro componentes de la formulación (Hombach, 2007).

Las proteínas prM y E del virus DEN 2 se sustituyeron también sobre un clon del virus de la EJ. El virus quimérico resultante mostró marcadores de atenuación y hasta el momento se evaluó sólo en ratones, donde indujo anticuerpos neutralizantes y protección contra el reto letal con el un virus DEN 2 (Chambers y cols, 2006).

2.11.3. Candidatos vacunales vivos recombinantes

Los genes estructurales del virus DEN se insertaron por vía recombinante en diferentes vectores vivos. La vacuna quimérica que se encuentra más avanzada hasta el momento es la que sustituye los genes PrM/E de los cuatro serotipos del virus DEN sobre la vacuna viva atenuada de FA (Chimerivax DEN), que se desarrolla por la compañía *Acambis* y se licencia por *Sanofi Pasteur* (Guirakhoo y cols, 2001). La evaluación de la formulación tetravalente Chimerivax DEN 1-4 en monos indujo anticuerpos neutralizantes, sin embargo, los animales desarrollaron viremias (generalmente causada por el serotipo 4) superiores a las observadas para otros candidatos vacunales (entre 10^2 - 10^3 ufp/mL) (Guirakhoo y cols, 2002). Recientemente se evaluó la interferencia de los cuatro componentes de esta formulación tetravalente en monos, donde se corroboró que los serotipos 1 y 4 eran dominantes en la inducción de anticuerpos neutralizantes y se identificaron los parámetros que afectan la interferencia en este modelo (Guy y cols, 2009). La evaluación en humanos de la formulación monovalente Chimerivax DEN 2 mostró seguridad e inmunogenicidad (Guirakhoo y cols, 2006), y de acuerdo a los datos preliminares, la formulación tetravalente también resultó segura en humanos. No obstante, ésta mostró el inconveniente de que debe ser administrada en dosis superiores a 10^4 ufp, que no son aprobadas en las regulaciones vacunales (Whitehead y cols, 2007). También se demostró ya la seguridad de la respuesta inmune celular inducida por la formulación tetravalente Chimerivax DEN 1-4, tanto en individuos *naïve* como inmunes a flavivirus (Guy y cols, 2008)

Los adenovirus son también empleados como plataforma para la expresión de las proteínas prM y E del virus del DEN (Holman y cols, 2007; Raja y cols, 2007). Este candidato se diseñó de forma tal que en un mismo vector se expresan los genes de las proteínas prM y E de dos serotipos del virus DEN, por lo que la formulación tetravalente incluye dos vectores de adenovirus. En un primer estudio la vacuna tetravalente indujo anticuerpos neutralizantes y respuesta celular a múltiples serotipos del virus DEN en ratones (Holman y cols, 2007). La evaluación en monos *rhesus* de esta formulación tetravalente mostró la inducción de anticuerpos neutralizantes y de niveles significativos de protección contra los cuatro serotipos del virus, por lo que actualmente está siendo programada para estudios en humanos (Raviprakash y cols, 2008).

La vacuna viva atenuada contra el sarampión, que es segura para humanos y que induce inmunidad de por vida después de una sola inmunización, se empleó como vector para la expresión de antígenos del virus DEN con fines vacunales. En este caso se expresó el dominio III de la proteína E del virus DEN 1 junto al ectodominio de la proteína M. Los ratones inmunizados con esta formulación mostraron anticuerpos neutralizantes de larga duración, específicos contra el virus DEN 1 (Brandler y cols, 2007). Sin embargo, aún se deben desarrollar los candidatos para el resto de los serotipos así como también queda por demostrar su capacidad protectora.

La región que codifica para el dominio III de la proteína E se incluyó también de forma recombinante en una cepa de *Lactococcus lactis*. La inmunización de ratones por vía mucosal con esta cepa bacteriana recombinante indujo una respuesta sistémica de anticuerpos neutralizantes contra el dominio III del virus DEN 2. No obstante, se observó una gran variabilidad en la respuesta de anticuerpos entre los animales de un mismo grupo (Sim y cols, 2008).

2.11.4. Vacunas de subunidades recombinantes

Las vacunas de subunidades recombinantes tienen dos ventajas fundamentales sobre las vacunas vivas atenuadas o recombinantes: (1) son seguras debido a su naturaleza no replicativa y (2) pueden inducir una respuesta de anticuerpos

balanceada ya que una preparación tetravalente puede ser equitativamente inmunogénica. Entre sus desventajas están: (1) que necesitan de adyuvantes para inducir una respuesta inmune óptima lo que puede incrementar la reactogenicidad, y (2) se requieren múltiples dosis para lograr una inmunidad de larga duración (Whitehead y cols, 2007).

Las proteínas del virus DEN (generalmente la proteína E), expresadas en diferentes sistemas, son evaluadas como candidatos vacunales de subunidad.

Uno de los candidatos más avanzados se desarrolla por la compañía americana *Hawaii Biotech* e incluye al fragmento soluble de la proteína E (80% E) junto a la proteína NS1 expresadas en *Drosophila S2*. Dicho candidato indujo títulos de anticuerpos neutralizantes elevados en monos después de tres dosis y protección frente al reto para algunas de las formulaciones ensayadas. Actualmente este candidato está programado para estudios de fase clínica (Hombach, 2007). La evaluación del fragmento soluble de la proteína E solo (80%) también indujo una protección significativa en monos *rhesus* cuando se administró en dosis de 20 µg formulado en sales de alúmina (Putnak y cols, 2005).

Debido a que el dominio III de la proteína E se identificó como inductor de una respuesta de anticuerpos neutralizantes específica de serotipo, diversas estrategias de subunidades recombinantes también están basadas en esta región. Inicialmente el dominio III de la proteína E del virus del DEN se expresó en *E. coli* fusionado a la TrpE (proteína del metabolismo del triptófano de *E. coli*). Las construcciones dominio III-TrpE de los cuatro serotipos reaccionaron con los líquidos ascíticos hiperinmunes contra el serotipo homólogo; sin embargo, tras la inmunización en ratones, no indujeron anticuerpos neutralizantes y tampoco confirieron protección frente al reto viral (Fonseca y cols, 1991). En el año 1995, Srivastava y cols fusionaron al dominio III de la proteína E y la proteína NS1 del virus DEN 2 a la proteína A de *Stafilococcus aureus* y lo expresaron en *E. coli*. Esta construcción genética reaccionó con los anticuerpos policlonales y monoclonales contra el serotipo homólogo y los ratones inmunizados con ella desarrollaron anticuerpos neutralizantes y resultaron protegidos frente al reto con el virus salvaje. No obstante, la alta afinidad de la proteína A por la IgG humana

limitó el posible uso de esta proteína de fusión como candidato vacunal (Srivastava y cols, 1995). Posteriormente, el dominio III de la proteína E del virus DEN 2 se expresó en *E. coli* fusionado a la proteína de unión a maltosa de *E. coli* (MBP, -del inglés- *maltose binding protein*). La evaluación inmunológica en ratones de la proteína recombinante dominio III-MBP desarrolló anticuerpos neutralizantes y protección parcial frente al reto con el virus homólogo (Simmons y cols, 1998). En un trabajo posterior, las construcciones correspondientes a los cuatro serotipos se evaluaron en una formulación tetravalente en ratones, donde se demostró el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos del virus del DEN (Simmons y cols, 2001a). El estudio más reciente de esta estrategia incluye la evaluación de la formulación dominio III DEN 2-MBP en monos. Sin embargo, a pesar de que los animales inmunizados mostraron títulos de anticuerpos neutralizantes altos, la viremia desarrollada después del reto con el virus salvaje fue muy elevada (Simmons y cols, 2006). Esta estrategia pudiera tener además el inconveniente de que la seguridad para humanos de la MBP no se conoce.

La estrategia cubana actual para el desarrollo de un candidato vacunal contra los virus del DEN (ejecutada en colaboración entre el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología y el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí), de la cual es parte este trabajo, también está basada en la expresión en *E. coli* del dominio III de la proteína E del virus del DEN, pero fusionado a la proteína P64k de *Neisseria meningitidis*. Esta formulación tiene la ventaja de que la seguridad y la capacidad de la P64k como proteína portadora de antígenos ya se demostraron en humanos (Perez y cols, 2001). Inicialmente se obtuvieron dos variantes: (1) el dominio III de la proteína E de cada uno de los serotipos insertado en el extremo N-terminal de la proteína P64k (variante de inserción), y (2) el dominio III de la proteína E de cada uno de los serotipos fusionado al extremo C-terminal de la proteína P64k (variante de fusión) (Zulueta y cols, 2003). La evaluación de las proteínas recombinantes de los cuatro serotipos en ratones mostró la inducción de anticuerpos neutralizantes y de protección parcial para los serotipos 1, 2 y 3 (Hermida y cols, 2004a; Hermida y cols, 2004b; Zulueta y cols, 2006). Sin embargo, debido a la baja inmunogenicidad de la proteína recombinante correspondiente al virus DEN 4 se desarrolló otra

construcción de este serotipo que contiene al dominio III de la proteína E fusionado dos veces dentro de la estructura de la proteína P64k, que indujo protección significativa frente al reto con el virus letal en ratones (Lazo y cols, 2009). Hasta el momento sólo las proteínas recombinantes del virus DEN 2 se evaluaron en monos. A pesar de que las dos variantes del serotipo 2 (fusión e inserción) indujeron anticuerpos neutralizantes y protección parcial frente al reto viral homólogo en monos, los animales inmunizados con la variante de fusión mostraron una reducción mayor de la viremia, por lo que se seleccionó esta variante para los estudios futuros del candidato vacunal (Hermida y cols, 2006).

Otra de las estrategias de subunidades recombinantes basadas en el dominio III de la proteína E del virus DEN es la obtención de antígenos que contienen los dominios III de dos o más serotipos del virus. El dominio III de la proteína E de los virus DEN 2 y DEN 4 se expresó de forma soluble en *E. coli* como una proteína de fusión recombinante. Los ratones inmunizados con esta proteína bivalente desarrollaron anticuerpos específicos a los serotipos 2 y 4, que lograron neutralizar la infección del virus *in vitro* (Khanam y cols, 2006a). En un estudio posterior este grupo desarrolló una proteína quimérica tetravalente expresada en *Pichia pastoris*, donde se incluyeron los dominios III de los cuatro serotipos. Esta proteína tetravalente indujo anticuerpos neutralizantes y una respuesta de células T específica a los cuatro serotipos en ratones (Etemad y cols, 2008).

También se desarrolló otra proteína recombinante que contiene los dominios III de la proteína E de los cuatro serotipos conectados de manera secuencial expresada en *E. coli*. Los anticuerpos inducidos por este candidato tetravalente protegieron al 70% de los ratones en un ensayo de neutralización *in vivo* con los serotipos 1, 2 y 4. Sin embargo, para el virus DEN 3 solo el 18% de los ratones resultaron protegidos (Chen y cols, 2007c).

Recientemente se describió un candidato vacunal que contiene una secuencia consenso del dominio III de los cuatro serotipos del virus. Los ratones inmunizados con esta proteína recombinante consenso desarrollaron anticuerpos neutralizantes de larga duración contra los cuatro serotipos (Leng y cols, 2009).

El dominio III de la proteína E se expresó incluso en un vector del virus del mosaico del tabaco, lo que permite su obtención libre de contaminantes patogénicos y el procesamiento por una maquinaria eucariota. Sin embargo, a pesar de que la proteína recombinante obtenida mostró una antigenicidad adecuada, los animales necesitaron un número elevado de dosis para desarrollar anticuerpos neutralizantes por lo que aún se debe trabajar en mejorar la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes obtenidas por esta vía (Saejung y cols, 2007).

Además de los antígenos relacionados a la proteína E, la proteína C del virus del DEN obtenida de forma recombinante en *E. coli* se evaluó como candidato vacunal de subunidades. Los ratones inmunizados con esta proteína recombinante resultaron protegidos frente al reto con el virus homólogo en ausencia de anticuerpos antivirales. Por tanto, esta estrategia constituye una variante atractiva para eliminar el riesgo de la ADA después de la vacunación, que constituye uno de los principales retos para el desarrollo de una formulación vacunal (Lazo y cols, 2007; López y cols, 2009).

Hasta el momento, ningunas de las formulaciones de subunidades recombinantes desarrolladas se evaluó en humanos y muy pocas en monos. De las cinco proteínas recombinantes evaluadas en monos (Guzman y cols, 2003b; Putnak y cols, 2005; Hermida y cols, 2006; Simmons y cols, 2006), sólo dos de ellas indujeron protección significativa frente al reto con el virus homólogo, la que contiene al 80% de la proteína E de DEN 2 (Putnak y cols, 2005) y la proteína de fusión dominio III-P46k de DEN 2 (Hermida y cols, 2006).

2.11.5. Vacunas de virus inactivado

Las vacunas de virus inactivado presentan las mismas limitaciones que las de subunidad recombinante. En la actualidad la vacuna inactivada más avanzada se desarrolla por investigadores del WRAIR y está basada sólo en el serotipo 2 del virus DEN. A pesar de que los monos inmunizados con dos dosis de 5 µg de esta vacuna formulada en cinco adyuvantes diferentes desarrollaron anticuerpos

neutralizantes, estos mostraron viremia después del reto viral (Putnak y cols, 2005).

2.11.6. Vacunas de ADN

La inmunización con plásmidos de ADN purificados posibilita el procesamiento del ADN por las células y permite la expresión de los antígenos virales codificados por el plásmido. La expresión de las proteínas virales *in situ* facilita su conformación correcta ya que sufren las mismas modificaciones post-traduccionales a las que son sometidas durante el curso de una infección natural. Sin embargo, las vacunas de ADN tienen la desventaja de inducir títulos moderados de anticuerpos neutralizantes (Raviprakash y cols, 2006; Costa y cols, 2007).

Raviprakash y cols desarrollaron un candidato vacunal de ADN que contiene los genes prM y E del virus DEN 1, cuya inmunogenicidad y capacidad protectora después del reto viral en monos se incrementó mediante la co-inmunización con genes que codifican para citoquinas y para proteínas inmuno-estimuladoras humanas (Raviprakash y cols, 2000; Raviprakash y cols, 2003). Asimismo, la inmunogenicidad en ratones del candidato similar que contiene a las proteínas prM y E del virus DEN 2 mejoró también mediante la sustitución de las regiones citoplasmáticas y de transmembrana de la proteína E por las de la proteína M asociada a lisosomas, junto a su co-inmunización con los genes que codifican para las citoquinas y para las proteínas inmuno-estimuladoras humanas. Esta combinación permitió dirigir los antígenos hacia las vesículas lisosomales y facilitó la presentación del antígeno quimérico en el contexto de las moléculas del MHC clase II de las células presentadoras de antígenos (Raviprakash y cols, 2001). La formulación similar que contiene a los genes prM y E del virus DEN 3 se evaluó también en monos, en los que indujo anticuerpos neutralizantes y protección parcial frente al reto viral (Blair y cols, 2006). Estos autores desarrollaron formulaciones de ADN que codifican para las proteínas prM y E de los cuatro serotipos en una sola secuencia (Apt y cols, 2005). La evaluación de esta variante tetravalente en monos *rhesus* indujo una respuesta de anticuerpos neutralizantes multivalente contra los serotipos 1, 2 y 3 y protección parcial sólo frente al serotipo

1, por lo que deben seguir trabajando en mejorar su inmunogenicidad y su capacidad protectora (Raviprakash y cols, 2006).

Actualmente está en desarrollo otro candidato de ADN basado en las proteínas prM y E del virus DEN, que indujo anticuerpos neutralizantes en ratones cuando se evaluó como formulación monovalente (Konishi y cols, 2000). La formulación tetravalente también indujo anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos en este mismo modelo (Konishi y cols, 2006).

Otro de los candidatos vacunales de ADN en estudio está basado en el gen que codifica para la proteína NS1 del virus DEN 2, junto a la secuencia señal de secreción del activador del plasminógeno de tejidos humanos. Esta construcción promueve la expresión correcta de la proteína NS1 en las células eucariota y posibilita la secreción de NS1 en su forma dimérica. Los ratones inmunizados con este candidato desarrollaron una respuesta elevada de anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus DEN 2 y resultaron protegidos totalmente frente al reto con el virus salvaje (Costa y cols, 2006a; Costa y cols, 2006b; Costa y cols, 2007). El dominio III de la proteína E del virus DEN también se emplea en el desarrollo de vacunas de ADN. Sin embargo, los animales inmunizados con las formulaciones mono o tetravalente desarrollaron títulos de anticuerpos neutralizantes bajos para los cuatro serotipos (1/10) y resultaron sólo parcialmente protegidos frente al reto viral (Mota y cols, 2005).

2.11.7. Estrategias de inmunización combinadas

Las estrategias de inmunización secuencial, que combinan diferentes candidatos, son empleadas para potenciar la respuesta inmune inducida por las formulaciones vacunales individuales contra el virus DEN.

El primer estudio publicado al respecto incluyó la evaluación en ratones del candidato que incluye al dominio III de la proteína E del virus DEN 2 fusionado a la MBP de *E.coli*, en combinación con una vacuna de ADN que expresaba los genes prM y E de este mismo serotipo. A diferencia de la inmunización con la proteína recombinante o el ADN solo, que indujeron anticuerpos IgG1 e IgG2a respectivamente, algunas de las combinaciones empleadas lograron inducir

ambas subclases de IgG (Simmons y cols, 2001b). La combinación de estos dos candidatos se evaluó recientemente en monos, con el empleo además de un virus DEN 2 inactivado. Sin embargo, a pesar de que se indujeron títulos de anticuerpos neutralizantes elevados en este modelo, los monos inmunizados con estas variantes no redujeron la viremia después del reto viral (Simmons y cols, 2006).

La inmunogenicidad del candidato tetravalente de ADN que incluye los genes prM y E del virus, evaluado recientemente en ratones (Konishi y cols, 2006), se incrementó mediante la co-inmunización con partículas extracelulares de DEN 2 o con la vacuna inactivada de la EJ. Estos regímenes de inmunización incrementaron la producción de anticuerpos neutralizantes y confirieron protección en los animales frente al desarrollo de viremia artificial después de la inoculación intravenosa con el virus DEN 2 (Imoto y Konishi, 2007).

La inmunización en monos de partículas virales de la EJ que expresan los genes prM y E del virus DEN 1, combinadas con una vacuna de ADN que codifica para estos mismos genes, indujo la producción de anticuerpos neutralizantes y de protección total frente al desarrollo de viremia después del reto viral (Chen y cols, 2007b).

Otra estrategia de inmunización combinada incluye un adenovirus recombinante que expresa al dominio III de la proteína E, junto a un plásmido que codifica para estos mismos genes. La combinación de estos dos antígenos resultó en la inducción de anticuerpos neutralizantes específicos contra el serotipo 2 y de una respuesta de células T de tipo Th1 (Khanam y cols, 2006b). Recientemente estos mismos autores desarrollaron una estrategia similar pero con un adenovirus recombinante que expresa los dominios III de los serotipos 2 y 4 en combinación con un plásmido que codifica para el mismo antígeno bivalente quimérico. Los resultados mostraron la inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes y de células T equivalentes para ambos serotipos, lo que demuestra la potencialidad de este enfoque para el desarrollo de una vacuna tetravalente (Khanam y cols, 2007).

Las estrategias de inmunización que combinan diferentes candidatos son un enfoque reciente, para las cuales sólo se tienen evidencias en modelos animales.

No obstante, los resultados obtenidos demuestran que la combinación de diferentes inmunógenos puede revertir las principales desventajas del empleo de candidatos replicativos o no replicativos por sí solos, e inducir una respuesta celular y humoral anti-DEN duradera que simule la inmunidad inducida después de la infección por el virus del DEN.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Medios de cultivo y soluciones de uso general

3.1.1 Memgane

Medio mínimo esencial (MEM, Gibco, EUA) con L-glutamina 2 mmol/L y aminoácidos no esenciales, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado a 56°C por 1h (SFBI, Sigma, EUA) y antibióticos (penicilina 0,1 UI/mL y estreptomycin 0,1 mg/mL).

3.1.2 Medio K562

Medio RPMI (Gibco, EUA) suplementado con 10% de SFBI y antibióticos (penicilina 0,1 UI/mL y estreptomycin 0,1 mg/mL).

3.1.3 Medio Vero

Medio 199 (Gibco, EUA) suplementado con 10% de SFBI (Sigma, EUA) y antibióticos (penicilina 0,1 UI/mL y estreptomycin 0,1 mg/mL).

3.1.4 Medio de recubrimiento

MEM 2X (Gibco, EUA) suplementado con 6% de SFBI (Sigma, EUA), L-glutamina 2 mM, carboximetilcelulosa 3 g/L y antibióticos (penicilina 0,1 UI/mL y estreptomycin 0,1 mg/mL).

3.1.5 Tampón de recubrimiento

Carbonato de sodio 15 mmol/L (Merck, Alemania) y bicarbonato de sodio 35 mmol/L (Sigma, EUA), pH 9,5.

3.1.6 PBS

Cloruro de sodio 140 mmol/L, cloruro de potasio 2,6 mmol/L, fosfato monobásico de potasio 1,5 mmol/L, fosfato dibásico de sodio 8,5 mmol/L (Sigma, EUA), pH 7,4.

3.1.7 Fosfato-citrato

Ácido cítrico 24 mmol/L, fosfato dibásico de sodio 53 mmol/L (Sigma, EUA), pH 5,5.

3.1.8 Solución sustrato

Ortofenilendiamina 0,5 mg/mL (Sigma, EUA) y 0,015% de peróxido de hidrógeno (Merck, Alemania) diluidos en tampón fosfato-citrato.

3.1.9 Solución de tinción

Ácido acético 1 mol/L (Merck, Alemania), *naphthol blue black* 1,6 mmol/L y acetato de sodio 166 mmol/L (Sigma, EUA).

3.2. Líneas celulares

3.2.1. BHK-21

La línea celular BHK-21 clono 15 (riñón de Hámster –del inglés- *baby hamster kidney*) obtenida a partir de la línea BHK-21 clono 13 (ATCC –del inglés *American Type Culture Collection*) y donada al laboratorio de arbovirus del IPK por el Prof. S. B. Halstead (actualmente asesor de la Iniciativa para una Vacuna Pediátrica en Dengue), se empleó para el ensayo de neutralización por reducción del número de placas (NRNP) y para la titulación de los virus por el método de formación de placas. Las células se crecieron a 37 °C en frascos plásticos de 75 cm² con medio Memgane, a razón de un pase semanal de 1:8. Para estas técnicas se prepararon suspensiones celulares con una concentración de 2×10^5 células/mL.

3.2.2. K562

La línea celular K562 que proviene de un paciente con leucemia mielogénica crónica (donada a nuestro laboratorio por el Prof. S. B. Halstead, actualmente asesor de la Iniciativa para una Vacuna Pediátrica en Dengue) se empleó para los ensayos de ADA. Estas células se crecieron a 37 °C en frascos plásticos de 75 cm² utilizando medio K562 y se mantuvieron a razón de un pase semanal de 1:8. Para la técnica se prepararon suspensiones celulares a una concentración de 4×10^5 células/mL.

3.2.3. Vero

La línea de células Vero (riñón de mono verde africano, ATCC, CCL-81) se empleó para el ensayo de aislamiento viral. Estas células se crecieron a 37 °C en frascos plásticos de 75 cm² con medio Vero, y se mantuvieron a una razón de pase semanal de 1:6.

3.3. Cepas virales

3.3.1. Cepas empleadas en la inoculación de los monos

En la tabla 1 se muestran las cepas virales de los serotipos 1 y 2 empleadas para la inoculación de los monos y las tareas en las que se utilizaron. Estas cepas se conservaron a -70 °C.

Tabla 1. Historial de pases, lugar y año de aislamiento de las cepas empleadas en la inoculación de los monos y tarea en que se utilizaron

Cepas virales	Historial de pases	Lugar de aislamiento	Año de aislamiento	Tarea
DEN 1 Jamaica*	5PC6/36HT 2PVer0	Jamaica	1977	Reto viral con DEN 1
DEN 2 A15	4PR 2PVer0	Cuba	1981	Reto viral con DEN 2

*donada por el Dr. Robert Shope de la Universidad de Texas, EUA, actualmente fallecido

PC6/36HT: Pases en la línea celular C6/36 HT

PVer0: Pases en la línea celular Vero

PR: Pases en ratón

3.3.2. Cepas empleadas en los ensayos inmuno-enzimáticos sobre fase sólida

En la tabla 2 se muestran las cepas virales de referencia de los cuatro serotipos empleadas en los ensayos inmuno-enzimáticos sobre fase sólida (ELISA). Estas cepas se crecieron en cerebro de ratón lactante (CRL) y se concentraron por el método sacarosa-acetona (Clarke y Casals, 1958). Los ELISA para la detección de anticuerpos totales contra cepas diferentes de DEN 2 se realizaron con cepas crecidas en cultivo de células (tabla 3). Todas estas cepas se conservaron a -70 °C.

Tabla 2. Cepas de referencia de los cuatro serotipos empleadas en los ELISA

Cepas virales	Historial de pases
DEN 1 Hawai	24PR
DEN 2 Nueva Guinea C (NGC)	24PR
DEN 3 H87	26PR
DEN 4 H241	25PR

PR: Pases en ratón

Tabla 3. Cepas crecidas en cultivo de células empleadas en los ELISA

Cepas virales	Historial de pases	Lugar de aislamiento	Año de aislamiento
DEN 2 A15	4PR 2PC6/36HT	Cuba	1981
DEN 2 I348600*	PM? 5PC6/36HT	Colombia	1986

*donada por el Dr. Robert Shope de la Universidad de Texas, EUA, actualmente fallecido

PC6/36HT: Pases en la línea celular C6/36 HT

PM?: Pases en mosquitos desconocidos

PR: Pases en ratón

3.3.3. Cepas empleadas en los ensayos de neutralización y de amplificación dependiente de anticuerpos

En la tabla 4 se muestran las cepas virales de los serotipos 1 y 2 empleadas en los ensayos de NRNP y se subrayan las cepas empleadas en la ADA. Estas cepas se conservaron a -70 °C.

Tabla 4. Historial de pases, lugar y año de aislamiento de las cepas utilizadas en los ensayos de neutralización y de amplificación dependiente de anticuerpos

Cepas virales	Historial de pases	Lugar de aislamiento	Año de aislamiento
DEN 1 West Pacific*	P? 2PC6/36HT	Nauru	1974
DEN 1 Jamaica**	7PC6/36HT	Jamaica	1977
DEN 2 A15	4PR 2PC6/36HT	Cuba	1981
DEN 2 Jamaica**	3PM 5PC6/36HT	Jamaica	1982
DEN 2 I348600**	PM? 5PC6/36HT	Colombia	1986

Las cepas sombreadas en gris se emplearon para los ensayos de ADA

*Suministrada por el Comité de Expertos en Estandarización de Productos Biológicos de la OMS

**donadas por el Dr. Robert Shope de la Universidad de Texas, EUA, actualmente fallecido

P?: Pases desconocidos

PC6/36HT: Pases en la línea celular C6/36 HT

PM: Pases en mosquitos

PM?: Pases en mosquitos desconocidos

PR: Pases en ratón

3.4. Proteínas recombinantes expresadas en *Escherichia coli*

En el estudio se emplearon las proteínas recombinantes de fusión correspondientes a los serotipos 1 y 2. Como control negativo de los esquemas de inmunización se empleó la proteína recombinante P64k. Las estrategias utilizadas para la clonación, la expresión en *E. coli* y la purificación de las proteínas recombinantes se describieron previamente (Zulueta y cols, 2003).

3.4.1. P64k

La P64k es una proteína de *N. meningitidis* de 64 kDa de peso molecular, expresada en *E. coli* como un antígeno soluble (Guillen y cols, 1998).

3.4.2. PD10

Contiene al dominio III (aa 286-426) de la proteína E de DEN 1 (cepa DEN 1 Jamaica) fusionado al extremo C terminal de la proteína P64k de *N. meningitidis* (Hermida y cols, 2004a).

3.4.3. PD5

Contiene al dominio III (aa 286-426) de la proteína E de DEN 2 (cepa DEN 2 Jamaica) fusionado al extremo C terminal de la proteína P64k de *N. meningitidis* (Hermida y cols, 2004b).

3.5. Adyuvación de las proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes se adyuvaron con igual volumen de adyuvante completo de Freund (Sigma, EUA) para la primera dosis de inmunización en monos y con adyuvante incompleto de Freund (Sigma, EUA) para las restantes dosis.

3.6. Animales de experimentación

En el estudio se emplearon un total de 10 monos adultos *Macaca fascicularis* (también conocidos como *Macaca cynomolgus*) con peso entre 2 y 4 Kg, y cuatro monos adultos *Macaca mulatta* (también conocidos como monos *rhesus*) con peso entre 5 y 7 Kg, suministrados por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio. Estos animales se mantuvieron en condiciones de aislamiento en el bioterio del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología y para su manipulación

se siguieron las normas cubanas para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los animales se anestesiaron por vía intramuscular con hidrocloreuro de ketamina (5 mg/kg) antes de cada manipulación. Para la selección de los animales se consideraron los diferentes indicadores clínicos (hemoglobina, hematocrito, transaminasas, urea, leucograma, plaquetas, heces fecales) así como la ausencia de anticuerpos anti-DEN y anti-P64k por ELISA (como se describe a continuación en los acápites 3.8.1 y 3.8.2, respectivamente).

3.7. Esquemas de inmunización en monos

3.7.1. Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectora de la proteína PD10 en monos *M. fascicularis* y *M. mulatta*

Un grupo de monos *M. fascicularis* y otro de monos *M. mulatta*, con dos monos cada uno (un mono hembra y uno macho por grupo), se inmunizaron con cuatro dosis de 0,1 mg de la proteína PD10 adyuvada en Freund. Como controles negativos del experimento se inmunizaron dos monos *M. fascicularis* y dos *M. mulatta* con cuatro dosis de 0,1 mg de la proteína P64k adyuvada en Freund. Las proteínas recombinantes (PD10 y P64k) se adyuvaron con adyuvante completo de Freund para la primera dosis e incompleto para las restantes tres dosis. El volumen de inmunógeno administrado fue de 0,5 mL por vía subcutánea en la espalda. El esquema de inmunización realizado fue: 0, 30, 90 y 150 días, con extracciones de sangre 15 días después de la tercera y de la cuarta dosis con el objetivo de evaluar la respuesta inmune humoral.

3.7.1.1. Ensayo de reto viral

Dos meses después de la última dosis de inmunización, todos los animales se inocularon por vía subcutánea con 10^6 ufp de la cepa DEN 1 Jamaica (tabla 1). El desarrollo de la viremia se evaluó en los sueros colectados en los diez días posteriores al reto por aislamiento viral en cultivo de células y por transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR -del inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*), según los protocolos descritos en los acápites 3.9.1 y 3.9.2 respectivamente.

Para evaluar la respuesta de anticuerpos generada en los monos inmunizados con PD10 o P64k después del reto con el virus DEN 1, se colectaron muestras de suero además en los días 21, 30 y 60 posteriores a la inoculación viral.

3.7.2. Esquema de inmunización con la proteína recombinante PD5 en monos *M. fascicularis*

La inmunización de los animales y la capacidad inmunogénica y protectora de la proteína PD5 se describieron previamente (Hermida y cols, 2006). Brevemente, dos grupos de monos *M. fascicularis* adultos (con tres animales cada uno) se inmunizaron con la proteína PD5 o con la proteína P64k como control negativo. Los animales se inocularon por vía subcutánea con cuatro dosis de 0,1 mg de las proteínas recombinantes adyuvadas en Freund (adyuvante completo para la primera dosis e incompleto para las restantes) en los días 0, 30, 90 y 210, y se retaron con 10^5 ufp de la cepa DEN 2 A15 a los 45 días de la última dosis.

La caracterización de la respuesta de anticuerpos inducida por la proteína PD5 después de la inmunización en monos se realizó con los sueros colectados 15 días después de la última dosis de inmunización.

Para evaluar la respuesta de memoria de anticuerpos generada en los monos inmunizados con PD5 después del reto viral con DEN 2, se colectaron muestras de suero en los días 10, 18, 32 y 69 después de la inoculación viral.

3.7.3. Infección de monos *M. fascicularis* con dos dosis del virus dengue 2

Tres monos *M. fascicularis* se inocularon subcutáneamente con 10^4 ufp de la cepa DEN 2 A15 y un año después de la infección primaria, estos se inocularon nuevamente con 10^4 ufp de la cepa DEN 2 A15. Para evaluar la respuesta de memoria de anticuerpos generada después de dos inoculaciones con el virus DEN 2, se colectaron muestras de suero en los días 0, 10, 15, 30 y 60 posteriores a la segunda inoculación viral.

3.7.4. Sueros humanos

Como controles del ensayo de inmunoamplificación viral se emplearon cuatro sueros colectados de individuos inmunes a DEN 1 (infectados durante la epidemia cubana ocurrida en los años de 1977-1979 y colectados 20 años después) (Kouri y

cols, 1983) y a cuatro sueros de individuos inmunes a DEN 2 (infectados durante la epidemia cubana de 1997, Santiago de Cuba y colectados en la fase convaleciente de la enfermedad) (Guzman y cols, 1999). La cepa de DEN 1 que circuló en Cuba en el año 1977 pertenece al genotipo V del serotipo 1 (Guzman y cols, 2000a) y la de DEN 2 que circuló en Santiago de Cuba en el año 1997 pertenece al genotipo asiático de este serotipo (Rodriguez-Roche y cols, 2005).

3.8. Ensayos para la detección de anticuerpos

3.8.1. *ELISA para la detección de los anticuerpos anti-P64k en los sueros de mono previo a la inmunización*

Las placas de poliestireno de 96 pozos (Costar, EUA) se recubrieron con una preparación de la proteína P64k pura (0,002 mg/mL) a razón de 0,1 mL por pozo y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. El bloqueo de las placas se realizó con 0,15 mL/pozo de albúmina sérica bovina (BSA -del inglés- *Bovine seric albumin*) a 2% en tampón de recubrimiento a 37 °C durante 1 h. Luego de dos lavados con PBS conteniendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) se adicionaron 0,1 mL/pozo de los sueros de mono diluidos en base dos a partir de una dilución inicial 1/100 (en PBS-T con 2% de BSA). Se incubó a 37 °C durante 1 h y las placas se lavaron nuevamente con PBS-T. A continuación las placas se incubaron a 37 °C por 1 h con anti-IgG de mono conjugada a peroxidasa (Sigma, EUA; diluida 1/10 000) a razón de 0,1 mL por pozo. Después de lavar nuevamente con PBS-T se añadió 0,1 mL/pozo de la solución sustrato, y las placas se incubaron a temperatura ambiente 30 minutos. La reacción se detuvo con 0,05 mL por pozo de ácido sulfúrico 5 m/L y se determinó la absorbancia a 492 nm.

Criterio de positividad: Una dilución de suero se consideró positiva cuando la relación: absorbancia (dilución de suero)/absorbancia (PBS) fue mayor o igual a dos.

3.8.2. *ELISA para la detección de los anticuerpos IgG totales anti-dengue en los sueros de mono o de humano*

Las placas de poliestireno de 96 pozos (Costar, EUA) se recubrieron con 0,1 mL del anticuerpo monoclonal 4G2 (anti-proteína E de los flavivirus, ATCC) a una

concentración de 0,005 mg/mL en tampón de recubrimiento y se incubaron a 37 °C por 2 h. El bloqueo de las placas se realizó con 0,15 mL/pozo de BSA a 2% en tampón de recubrimiento a 37 °C durante 1 h. Posteriormente las placas se lavaron tres veces con PBS-T y se añadió 0,1 mL/pozo de la preparación del antígeno a una dilución saturante previamente establecida. Como control negativo de antígeno se utilizó CRL no infectado en los casos en que se empleó antígeno proveniente de cerebro de ratón o sobrenadante de cultivo (SC) cuando se empleó virus crecido en cultivo de células. Las placas se incubaron a 4 °C durante toda la noche y luego de tres lavados en las mismas condiciones descritas anteriormente, se adicionaron los sueros diluidos al doble desde 1/250 hasta 1/512 000 en diluyente de muestra (PBS-T con 1% de CRL o SC y 1% de líquido ascítico normal de ratón). Como control positivo se empleó un suero de mono (tras dos inoculaciones virales) o de humano (tras infección secundaria) diluido 1/2 000 en diluyente de muestra. Después de la incubación a 37 °C por 1 h, las placas se lavaron nuevamente con PBS-T y se incubaron a 37 °C durante 1 h con anti-IgG de mono o de humano (según el caso) conjugada a peroxidasa (Sigma, EUA; diluida 1/10 000 o 1/1 000 respectivamente) a razón de 0,1 mL por pozo. Después de lavar nuevamente con PBS-T se añadió 0,1 mL/pozo de la solución sustrato, y las placas se incubaron a temperatura ambiente 30 minutos. La reacción se detuvo con 0,05 mL por pozo de ácido sulfúrico 5 m/L y se determinó la absorbancia a 492 nm.

Criterio de positividad: Una dilución de suero se consideró positiva cuando la relación: absorbancia (dilución de suero frente al antígeno de dengue)/absorbancia (dilución de suero frente al control negativo de antígeno) fue mayor o igual a dos. El título de anticuerpos de cada suero se expresó como la máxima dilución del mismo que mostró un valor positivo.

3.8.3. Ensayo de neutralización por reducción del número de placas

Los sueros se diluyeron en base 10 desde 10^{-1} hasta 10^{-4} en medio de cultivo celular Memgane y la primera dilución se trató con cloroformo para su esterilización. Cada una de las diluciones de suero se mezcló con igual volumen

de la dilución de trabajo del virus (conteniendo 30 ufp/0,05 mL) y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ a 4% por 1 h. El control viral consistió en una mezcla de la dilución de trabajo del virus con igual volumen de medio de cultivo celular Memgane y se incubó en las mismas condiciones. Posteriormente, 0,05 mL de cada una de las mezclas virus-suero y del control viral se inocularon en 0,5 mL de la suspensión de células BHK-21, sembradas previamente en placas plásticas de 24 pozos. Después de inoculadas, las células se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ a 4% durante 4 h. A continuación, se añadió el medio de recubrimiento a razón de 0,5 mL por pozo y las células se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ a 4% durante cinco días para la cepa DEN 2 A15, seis días para DEN 2 Jamaica y DEN 2 I348600 y siete días para DEN 1 West Pacific y DEN 1 Jamaica. Luego de la incubación se eliminó el medio de cultivo celular y se lavaron las monocapas celulares con agua corriente. A cada pozo se le añadió 0,5 mL de la solución de tinción. Después de 30 minutos en reposo se realizó un segundo lavado y las monocapas celulares se dejaron secar a temperatura ambiente.

Criterio de lectura: El valor porcentual de reducción del número de placas virales con respecto al control viral se calculó según la relación:

$$\% \text{ de reducción} = [1 - (X_s/X_m)] \times 100\%$$

En la cual:

X_s -- promedio del número de placas obtenido para la dilución de suero.

X_m -- promedio del número de placas obtenido para el control viral.

Mediante la fórmula anterior, a cada dilución de suero se le determinó su valor porcentual de reducción del número de placas virales. Estos datos se llevaron a un papel probit (regresión lineal) para determinar la dilución de suero que reduce en un 50% el número de placas virales con respecto al control viral, la que representa el título de anticuerpos neutralizantes del suero en cuestión. Los títulos inferiores a 1/10 se consideran como negativos (Morens y cols, 1985; Alvarez y cols, 2005).

3.8.4. Ensayo de amplificación dependiente de anticuerpos

Los sueros problemas se diluyeron en base 10 desde 10^{-1} hasta 10^{-5} en medio K562 y la primera dilución se trató con cloroformo para su esterilización. Cada una de las diluciones de suero (0,05 mL) se mezcló con igual volumen de la dilución del virus (multiplicidad de infección final de 0,025) en placas de cultivo de 96 pozos (Costar, EUA). El control viral consistió en la mezcla de la dilución de virus con igual volumen de medio K562. Las mezclas se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ a 4% por 1 h. Posteriormente se añadió la suspensión de células K562 a razón de 0,1 mL/pozo y las placas se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ a 4% durante 48 h. Los títulos virales obtenidos después del ensayo de amplificación se determinaron por el método de formación de placas en células BHK-21 (Morens y cols, 1985; Alvarez y cols, 2005).

3.8.4.1. Titulación viral mediante la formación de placas en células BHK-21

Cada uno de los pozos de la placa de 96 donde se realizó la amplificación dependiente de anticuerpos se inoculó por duplicado en 0,05 mL de suspensión de células BHK-21, previamente sembradas en placas de 24 pozos, y luego las placas de 24 pozos se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ a 4% por 4 h. Posteriormente se añadió el medio de recubrimiento a razón de 0,5 mL por pozo y las placas se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ a 4% durante cinco días para la cepa DEN 2 A15 y 6 días para la cepa DEN 2 I348600. Luego de la incubación se eliminó el medio de cultivo celular y se lavaron las monocapas celulares con agua corriente. A cada pozo se le añadió 0,5 mL de la solución de tinción. Después de 30 minutos en reposo se realizó un segundo lavado y las monocapas celulares se dejaron secar a temperatura ambiente.

El criterio de inmunoamplificación se estimó mediante la fórmula de Detre (Detre y White, 1970; Halstead y cols, 1984), donde los valores iguales o superiores a 1,96 son considerados como positivos:

$$(X_1 - X_0) / \sqrt{(X_1 + X_0)} \geq 1,96$$

En la cual:

X₁: número de placas de la dilución de suero

X₀: número de placas del control de virus

3.9. Detección de la viremia en los monos inoculados con el virus dengue

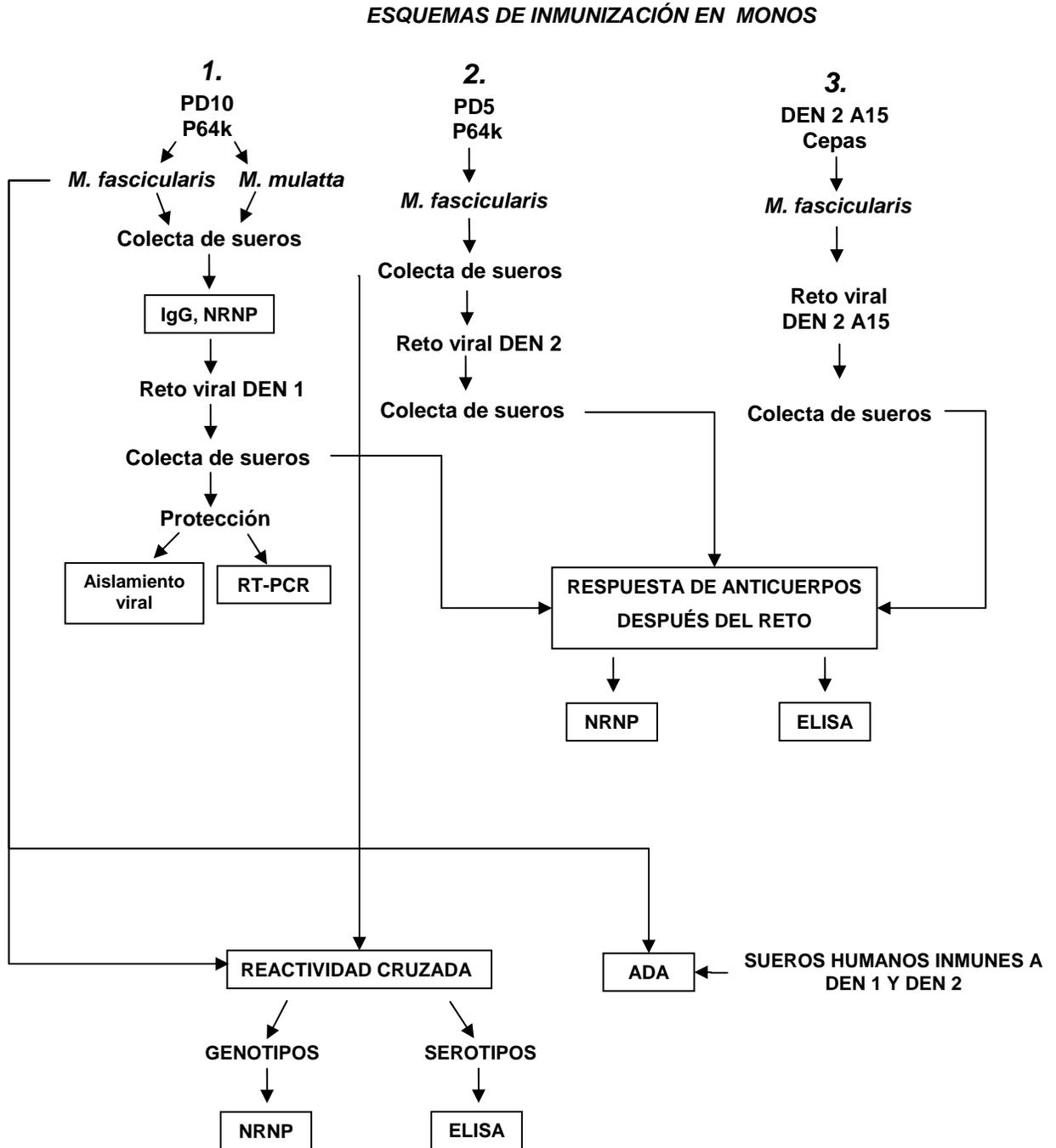
3.9.1. Aislamiento viral en cultivo de células e identificación del virus

Para el aislamiento viral 0,1 mL de las muestras de suero sin diluir, colectadas entre el primero y el décimo día posterior a la inoculación viral, se inocularon en monocapas confluentes de células Vero. Las células inoculadas se agitaron por 1 h a 37 °C y después se centrifugaron durante 30 minutos a 2 000 rpm y 37 °C (Rodríguez-Roche y cols, 2000). Posteriormente, las células inoculadas se recubrieron con 1 mL de medio Vero y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante siete días. La identificación viral se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales específicos a los cuatro serotipos del virus DEN (Henchal y cols, 1982).

3.9.2. RT-PCR

La extracción del ARN viral a partir de las muestras de suero colectadas entre el primero y el décimo día posterior a la inoculación viral se realizó por el protocolo del *Trizol LS Reagent (Gibco BRL)*, según las indicaciones del fabricante. La detección y la tipificación de los virus DEN se realizó mediante la amplificación de la región C-prM-M del genoma (Lanciotti y cols, 1992; Rosario y cols, 1998a).

3.10. Diagrama de trabajo



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectora de la proteína recombinante de dengue 1 en monos *M. fascicularis* y *M. mulatta*

Con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad de la proteína recombinante de DEN 1 que contiene al dominio III de la proteína E fusionado a la proteína P64k de *N. meningitidis* (PD10) en un modelo cercano al humano, se inmunizaron monos *M. fascicularis* y monos *M. mulatta* con cuatro dosis de esta proteína adyuvada en Freund. Los monos *M. mulatta* muestran los resultados más cercanos al hombre de acuerdo al desarrollo de viremia y a la respuesta serológica inducida (Halstead y Palumbo, 1973). Sin embargo, debido a la baja disponibilidad de estos, es importante la validación de otras especies como los monos *M. fascicularis* para la evaluación de las proteínas recombinantes P64k-dominio III. Con el empleo de Freund como adyuvante perseguimos la inducción de una respuesta inmune óptima que permita demostrar la potencialidad de esta proteína en monos.

Todos los animales empleados para el esquema de inmunización no presentaron anticuerpos previos al virus DEN o a la proteína P64k. La presencia de anticuerpos a la proteína portadora podría interferir en la inmunidad inducida por la proteína PD10.

La inmunogenicidad de la proteína PD10 se analizó primeramente de acuerdo a la respuesta de anticuerpos IgG totales anti-DEN 1 detectada por ELISA en los sueros colectados a los 15 días de la tercera y de la cuarta dosis. Como se muestra en la figura 1, los animales inmunizados con la proteína PD10, tanto *M. fascicularis* como *M. mulatta*, mostraron títulos elevados de anticuerpos IgG específicos a DEN 1 a los 15 días de la tercera y de la cuarta dosis.

La evaluación de la respuesta de anticuerpos IgG se realizó empleando la cepa de referencia DEN 1 Hawaii crecida en cerebro de ratón lactante. El criterio de selección de esta cepa fue práctico puesto que este sistema de multiplicación viral en cerebro de ratón es más económico en Cuba que el requerido para multiplicar cepas no neurovirulentas en cultivos celulares. Las cepas de DEN incluidas dentro de un mismo serotipo presentan una identidad de secuencia superior al 90% (Laille y Roche, 2004), por lo que la respuesta de anticuerpos IgG totales detectada por ELISA no muestra diferencias entre estas. Aún para la respuesta de anticuerpos inducida por el dominio III de la proteína E, que se postula es más específica (Simmons y cols, 2001a), se demostró que los anticuerpos IgG totales determinados por ELISA no diferencian entre las cepas de un mismo serotipo (Fleitas, 2007).

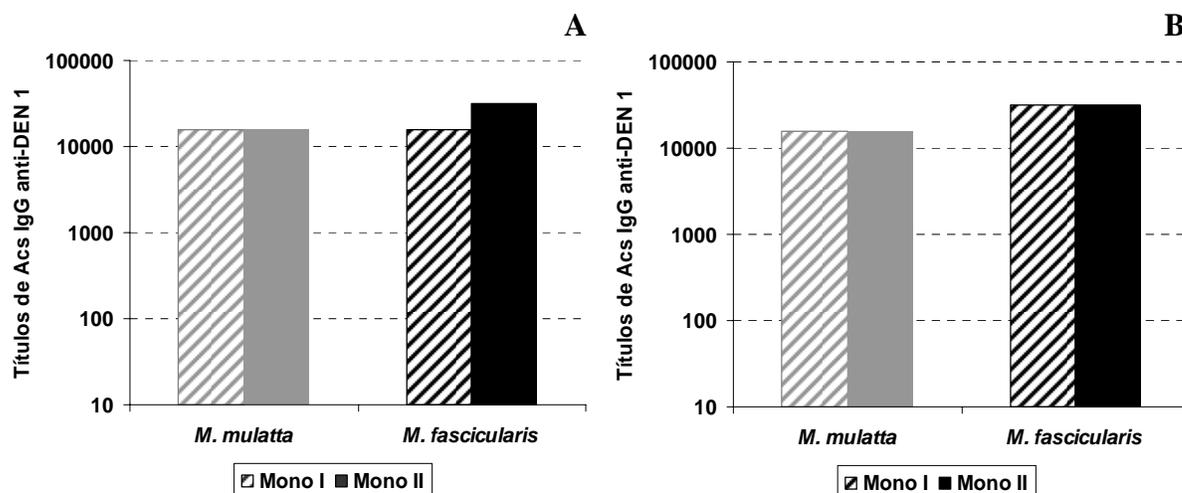


Figura 1. Títulos de anticuerpos IgG anti-dengue 1 en los sueros de los monos *M. fascicularis* y *M. mulatta* inmunizados con PD10. Los animales se inocularon con cuatro dosis de 0,1 mg de PD10 y los sueros se colectaron a los 15 días de la tercera dosis (A) y a los 15 días de la cuarta dosis (B). Los títulos de Acs IgG se detectaron por ELISA a la cepa DEN 1 Hawaii y se estimaron como la mayor dilución de suero que mostró un valor positivo. Se representa el inverso de los títulos de Acs IgG para cada animal de forma individual.

La capacidad neutralizante de los anticuerpos generados en monos por la inmunización con PD10 se evaluó por la técnica de NRNP en células BHK-21 y con la cepa DEN 1 West Pacific. Esta es la cepa recomendada por la OMS para

los ensayos de neutralización relacionados a la evaluación de candidatos vacunales del virus DEN 1, para homogenizar los datos obtenidos en los diferentes laboratorios (Roehrig y cols, 2008).

Las dos especies de mono inmunizadas con la proteína PD10 mostraron títulos de anticuerpos neutralizantes a los 15 días después de la tercera y de la cuarta dosis (figura 2). Esta respuesta de anticuerpos neutralizantes resultó superior en los monos *M. fascicularis* en comparación con los *M. mulatta* tanto 15 días después de la tercera como de la cuarta dosis, lo que demuestra la utilidad de este modelo animal para evaluar la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes P64k-dominio III.

A diferencia de los anticuerpos IgG totales que no se incrementaron después de la cuarta dosis, la capacidad neutralizante de estos anticuerpos resultó superior para todos los animales independientemente de la especie (en 5,4 y 2,9 veces como media para los monos *M. fascicularis* y *M. mulatta* respectivamente), por lo que el esquema de inmunización de cuatro dosis es recomendable en este modelo animal. El incremento de los títulos de anticuerpos neutralizantes después de la cuarta dosis puede ser explicado por los procesos de maduración de la afinidad de los anticuerpos que ocurren en la medida que las células B sufren encuentros repetidos con el antígeno, y por la posterior selección de los clones más afines (Janeway y cols, 2005). Para las entidades virales se postula una correlación directa entre la afinidad de los anticuerpos y la capacidad neutralizante de estos (Janeway y cols, 2005). En el caso del virus dengue en particular, recientemente se demostró que la afinidad de los anticuerpos monoclonales correlaciona directamente con su capacidad neutralizante (Matsui y cols, 2009).

Los niveles de anticuerpos neutralizantes generados después de la inmunización con la proteína recombinante PD10 en monos, resultaron comparables a los títulos promedio geométrico (TPG) de anticuerpos detectados después del reto viral en los monos controles (figura 3). Este resultado permite afirmar que la proteína PD10 induce títulos de anticuerpos neutralizantes equivalentes a los desarrollados frente a una inoculación con el virus DEN 1 completo.

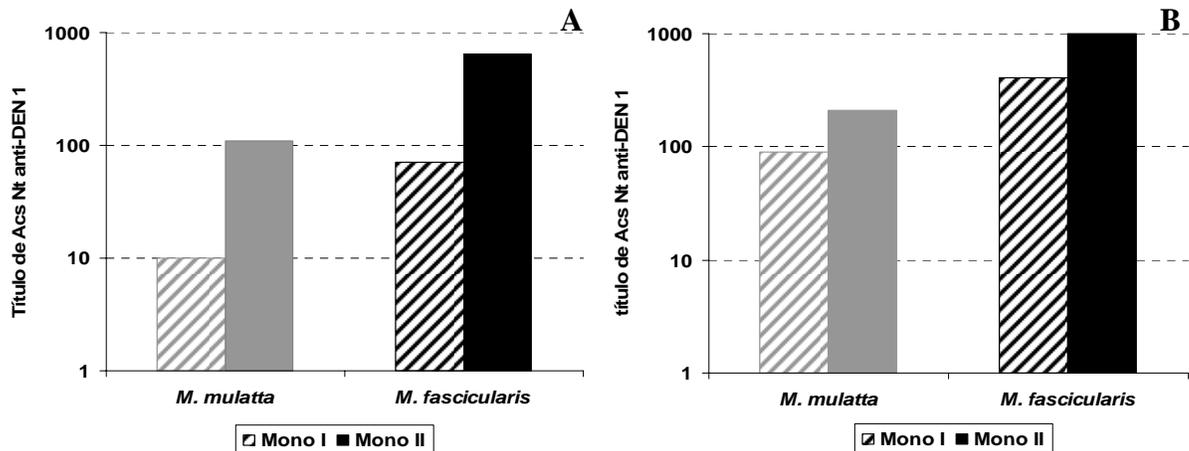


Figura 2. Títulos de anticuerpos neutralizantes anti-dengue 1 en los sueros de los monos *M. fascicularis* y *M. mulatta* inmunizados con PD10. Los animales se inocularon con cuatro dosis de 0,1 mg de PD10 y los sueros se colectaron a los 15 días de la tercera dosis (A) y a los 15 días de la cuarta dosis (B). Los títulos de Acs Nts se evaluaron mediante NRNP a la cepa DEN 1 West Pacific y se estimaron como la dilución de suero que redujo en un 50% el número de placas virales. Se representa el inverso de los títulos de Acs Nts para cada animal de forma individual.

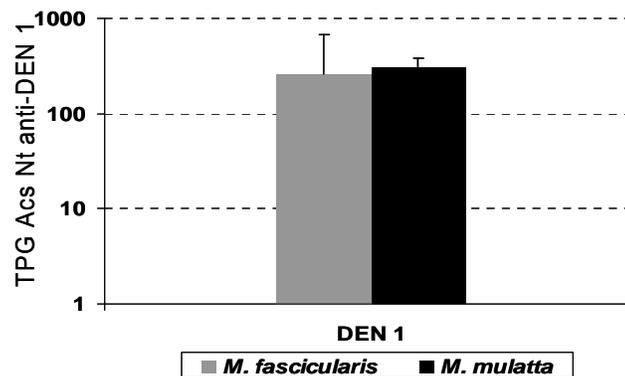


Figura 3. Títulos de anticuerpos neutralizantes anti-dengue 1 en los sueros de los monos *M. fascicularis* y *M. mulatta* inoculados con dengue 1. Dos animales de cada especie se inocularon con 10^6 ufp de la cepa DEN 1 Jamaica. Los sueros se colectaron a los 60 días de la inoculación viral y los títulos de Acs Nts se evaluaron mediante NRNP frente a la cepa DEN 1 West Pacific, estimados como la dilución de suero que redujo en un 50% el número de placas virales. Se representa el inverso de los TPG de Acs Nts \pm DS para cada grupo (n=2).

El presente estudio constituye el primer reporte en la literatura relacionado con la evaluación de una proteína recombinante del serotipo 1 en monos. Los datos obtenidos con formulaciones del virus DEN 1 se limitan a estrategias basadas en virus vivos atenuados o recombinantes y a vacunas de ADN. Los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos después de la inmunización de monos con una vacuna de ADN que contiene a los genes prM y E del virus DEN 1 fueron bajos, y aún cuando estos se incrementaron con la adición de secuencias inmunoestimuladoras a la formulación, los títulos máximos resultaron comparables a los inducidos por PD10 (Raviprakash y cols, 2000; Raviprakash y cols, 2003). Los títulos de anticuerpos neutralizantes generados por PD10 en monos son similares además a los detectados en los monos inmunizados con el candidato Chimerivax DEN 1, que contiene los genes prM y E de este serotipo sobre el esqueleto de la cepa vacunal atenuada de FA (Guirakhoo y cols, 2001), así como también a los estimulados por los candidatos vacunales de DEN 1 atenuados por introducción de deleciones en el extremo 3' del genoma (Markoff y cols, 2002; Whitehead y cols, 2003a; Durbin y cols, 2006a). Los títulos inducidos por PD10 en monos resultaron incluso superiores a los referidos para algunas de las formulaciones basadas en virus vivos. Este es el caso de la evaluación en monos del candidato que incluye a los genes prM y E del virus DEN 1 sobre el esqueleto de la cepa atenuada de DEN 4 por deleción de 30 nucleótidos en el extremo 3' (Blaney y cols, 2007) y de la evaluación en humanos de un candidato de DEN 1 atenuado por la vía convencional (Kanethasan y cols, 2001).

Con los elementos anteriores se demuestra que la proteína recombinante PD10 induce títulos de anticuerpos neutralizantes similares a los desarrollados por la infección con el virus DEN 1, y que estos anticuerpos resultan comparables a los referidos para los candidatos replicativos de este serotipo en monos. Los anticuerpos neutralizantes son considerados un mecanismo de protección importante frente a la infección por el virus DEN. Las principales evidencias al respecto se obtuvieron a partir de los estudios de niños recién nacidos de madres inmunes a DEN, los que resultaron protegidos frente a la infección durante los cinco primeros meses de edad, cuando los anticuerpos transferidos pasivamente a

través de la madre eran aún elevados. Sin embargo, cuando estos anticuerpos disminuyeron, se incrementó el riesgo de desarrollo de la forma severa de la enfermedad en estos niños (Halstead y cols, 1969). Además, en varias evaluaciones de candidatos contra los cuatro serotipos del virus DEN, los niveles de protección obtenidos frente al reto viral se correlacionan con los niveles de anticuerpos neutralizantes presentes (Bray y cols, 1996; Velzing y cols, 1999; Men y cols, 2000; Blair y cols, 2006; Blaney y cols, 2007).

Para evaluar la capacidad protectora de la inmunidad inducida por la proteína PD10, todos los monos se retaron con 10^6 ufp del virus DEN 1 dos meses después de la última dosis. Los monos desarrollan viremia después de la inoculación del virus DEN, por lo que la protección en este modelo se define como la reducción de la viremia después del reto viral. La viremia se evaluó mediante el aislamiento del virus en cultivo de células y por la detección del ARN viral mediante RT-PCR, ambos procedimientos a partir de los sueros colectados de los monos en los 10 días posteriores al reto viral. La protección puede ser definida en tres categorías: (1) protección total cuando no se detecta viremia en los monos inoculados con el virus, (2) protección parcial cuando el número de días virémicos se reduce en los monos inmunizados con PD10 con respecto a los detectados en los monos controles no inmunes a DEN, (3) no protección cuando los monos inmunizados con PD10 muestran una media de días virémicos similar a la observada en los monos controles.

Como se muestra en la tabla 5, tanto los monos *M. fascicularis* como *M. mulatta* inmunizados con PD10 redujeron el número de días virémicos comparado con los monos controles inmunizados con la proteína P64k en cada caso.

Tabla 5. Viremia desarrollada en los monos *M. fascicularis* y *M. mulatta* después del reto con el virus dengue 1, estimada de acuerdo a la detección del virus por aislamiento viral y por RT-PCR

Monos	Grupo	Monos ^a	Viremia después del reto viral en los días ^b										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>M. fascicularis</i>	PD10	I											
		II											
	P64k	I			+	+	+						
		II											
<i>M. mulatta</i>	PD10	I	+										
		II											
	P64k	I		+		+	+						
		II			+	+	+	+	+				

^aLos grupos de monos (n=2) *M. fascicularis* y *M. mulatta* inmunizados con 0,1 mg de PD10 o de P64k adyuvada en Freund en los días 0, 30, 90 y 150 se retaron al día 210 con 10⁶ ufp de la cepa DEN 1 Jamaica.

^bLa viremia se determinó en los sueros colectados en los diez días posteriores a la infección a través de la detección del ARN viral por RT-PCR (cuadros sombreados en gris) y del aislamiento del virus después de la inoculación del suero puro en células Vero (+).

En los monos *M. fascicularis* inmunizados con PD10 no se detectó virus por aislamiento en cultivo de células y el ARN viral se confirmó sólo en uno de ellos a los días seis y siete después del reto viral, mientras que los monos controles inmunizados con P64k desarrollaron viremia durante 1,5 y 3 días, estimada por aislamiento viral y por RT-PCR, respectivamente. A pesar de que el ARN viral se detectó en ambos monos *M. fascicularis* controles, el aislamiento viral fue negativo en uno de ellos. La RT-PCR presenta mayor sensibilidad y puede detectar ARN a partir de partículas virales no infectivas, a diferencia del aislamiento viral que depende de la infectividad y de la carga viral en el suero (Rosario y cols, 1998b; Wang y cols, 2003).

De los monos *M. mulatta* inmunizados con PD10, uno resultó totalmente protegido mientras que en el otro se detectó viremia en un día por aislamiento viral y en cuatro días por RT-PCR. Los monos *M. mulatta* inmunizados con P64k mostraron un período de viremia de cuatro y cinco días detectado por aislamiento viral y por RT-PCR, respectivamente.

A pesar de que algunos autores consideran la viremia al primer día después del reto como el resultado de una diseminación rápida del virus (Markoff y cols, 2002), ésta podría representar remanentes de la inoculación viral, especialmente cuando el aislamiento viral y la RT-PCR resultaron negativos al segundo día (mono *M. mulatta* I). Un ciclo de replicación para el virus DEN toma alrededor de 30 horas por lo que no se espera la detección de viremia a las 24 horas como función de la replicación viral.

Con las consideraciones anteriores se puede concluir que tanto los monos *M. mulatta* como *M. fascicularis* inmunizados con PD10 mostraron protección total frente al reto con el virus DEN 1, de acuerdo a la detección de la viremia por aislamiento viral, que representa directamente la presencia de partículas virales infectivas. El ARN viral se detectó tanto en los monos *M. fascicularis* como *M. mulatta* inmunizados con PD10, sin embargo, se observó una reducción notable en la viremia con respecto al control viral, lo que se corresponde con una protección parcial frente al reto viral. La RT-PCR presenta una sensibilidad mayor para detectar la existencia del virus en comparación con el aislamiento viral (Wang y cols, 2003). Sin embargo, la RT-PCR puede detectar genomas virales a partir de complejos inmunes no infectivos o de partículas virales defectivas.

El empleo de sólo dos animales en cada uno de los grupos evaluados constituyó una limitación para estimar la protección frente al reto viral. De los monos inmunizados con PD10, tanto *M. fascicularis* como *M. mulatta*, uno resultó totalmente protegido frente al reto viral, mientras que el otro mostró viremia de acuerdo a la detección de ARN viral. Es importante considerar que estos monos funcionan como individuos diferentes, en los cuales el sistema inmune responde de manera también variable. El uso de pocos monos para las evaluaciones vacunales se reconoce mundialmente como uno de las atenuantes de los estudios preclínicos en este modelo.

Resultó llamativo que dos muestras de suero positivas por aislamiento viral resultaron negativas por RT-PCR (*M. mulatta*, P64k I y II, días 2 y 4 respectivamente), aún cuando este segundo método tiene mayor sensibilidad. Este hecho puede ser explicado por la inhibición de la transcripción reversa por

inhibidores presentes en el suero animal, como es el caso de la hemoglobina (De Paula y Lopes da Fonseca, 2002), de ahí la necesidad de emplear varios métodos de detección para evaluar la viremia. Existen algunos datos publicados que también muestran incongruencias puntuales entre la detección de la viremia por RT-PCR y por aislamiento en cultivos celulares. En la evaluación de una cepa de DEN atenuada por mutaciones puntuales en el extremo 3', se obtuvo aislamiento viral después del reto en uno de los monos retados con 10^6 ufp de DEN 1 hasta el día 2 por RT-PCR y hasta el día 3 mediante titulación viral por placas (Markoff y cols, 2002). Asimismo, en otro estudio se demostró aislamiento del virus DEN 2 a partir del suero de los monos controles al tercer día después del reto, sin detección de ARN viral (Velzing y cols, 1999).

El presente trabajo constituye la primera evidencia de la capacidad protectora de las proteínas recombinantes de DEN 1 en el modelo de monos. La protección observada después del reto viral en los animales inmunizados con la proteína recombinante PD10, supera a la reportada en la mayoría de los estudios en monos con proteínas recombinantes de otros serotipos del virus. Este es el caso de los monos *M. mulatta* inmunizados con tres dosis de la proteína recombinante de DEN 2 que contiene al dominio III de la proteína E del virus fusionado a la MBP de *E. coli*, que desarrollaron una viremia elevada después del reto viral estimada incluso por aislamiento en células Vero (Simmons y cols, 2006). De igual forma, los sueros de los monos *M. fascicularis* inmunizados con una proteína recombinante de la envoltura del virus DEN 2 mostraron tanto aislamiento como RT-PCR positiva (Velzing y cols, 1999). Aún cuando algunos de los candidatos basados en proteínas recombinantes indujeron protección parcial en monos, el número de días virémicos en estos fue superior a los que se detectaron en este trabajo en los animales inmunizados con la proteína recombinante PD10. En este sentido, la inmunización de monos *M. fascicularis* con una proteína recombinante de la envoltura del virus DEN 4 indujo protección parcial frente al reto viral de acuerdo a la RT-PCR, sin embargo, la media de la duración de la viremia fue superior a la obtenida en nuestro estudio después del reto de los animales inmunizados con PD10 (Guzman y cols, 2003b). Los resultados más prometedores referidos en

monos hasta el momento se obtuvieron con una proteína recombinante que contiene el 80% de la envoltura viral de DEN 2, administrada en dosis de 20 µg y formulada en sales de alúmina (Putnak y cols, 2005). Los monos *rhesus* inmunizados con esta variante redujeron totalmente la viremia después del reto de acuerdo al aislamiento viral y significativamente de acuerdo a la RT-PCR (Putnak y cols, 2005).

La protección conferida en los monos inmunizados con PD10 resultó comparable a la obtenida previamente para la proteína quimérica homóloga del serotipo 2 en monos (PD5). Los monos inmunizados con PD5 resultaron también totalmente protegidos de acuerdo a la detección de la viremia por aislamiento viral y parcialmente protegidos de acuerdo a la detección por RT-PCR (Hermida y cols, 2006).

El análisis de los niveles de protección obtenidos en los monos inmunizados con la proteína recombinante PD10, en conjunto con los niveles de anticuerpos neutralizantes desarrollados en estos animales, indica que la neutralización medida *in vitro* no es el único marcador de protección frente al reto viral en este modelo. A pesar de que todos los monos inmunizados con la proteína quimérica indujeron anticuerpos neutralizantes, las protecciones alcanzadas fueron variables (dos monos completamente protegidos y dos protegidos parcialmente). Estas evidencias reflejan que existen otros mecanismos adicionales que median la protección frente al reto viral en monos, o que las técnicas de neutralización *in vitro* no reflejan exactamente este fenómeno *in vivo*.

En la técnica de neutralización empleada en este trabajo se utilizan células de riñón de hámster recién nacido que no son dianas naturales de la infección. En un estudio prospectivo realizado en niños tailandeses se demostró que la correlación entre la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-DEN previo a la infección y la protección frente a la infección subsiguiente depende de las células empleadas en el ensayo de neutralización (Kliks y cols, 1989). Cuando se emplearon cultivos de monocitos humanos frescos para el ensayo de neutralización el virus resultó totalmente neutralizado por los sueros de los niños que luego desarrollaron infecciones secundarias asintomáticas, mientras que se amplificó por los sueros

de los niños que desarrollaron infecciones secundarias sintomáticas. Sin embargo, el uso de una línea celular monocítica humana mostró amplificación del virus en ambos casos y ésta fue incluso superior en los niños que desarrollaban infección asintomática (Kliks y cols, 1989). También se demostró anteriormente que las cepas empleadas en el ensayo de neutralización pueden influir en los títulos de anticuerpos obtenidos. Se plantea que los aislamientos recientes del virus DEN permiten la detección de títulos mayores de anticuerpos neutralizantes específicos al serotipo homólogo y menores a los serotipos heterólogos, mientras que las cepas con un número de pases elevado en cultivos celulares detectan mayores títulos de anticuerpos con reactividad cruzada (Martin y cols, 2006). Por tanto, es necesario desarrollar nuevos métodos de neutralización que muestren mayor sensibilidad y que a la vez correlacionen con la protección *in vivo*. Uno de los enfoques actuales es el empleo de líneas celulares humanas transfectadas con DC-SIGN (molécula propuesta como receptor o co-receptor del virus) para incrementar su susceptibilidad, y la detección de la infección viral mediante citometría de flujo (Martin y cols, 2006; Hombach y cols, 2007).

Aún cuando las condiciones de la técnica de neutralización pueden influir en estos resultados, no se debe descartar la participación de otros mecanismos de la inmunidad en la protección frente a la infección por DEN. La inmunización con proteínas solubles por vía sistémica estimula principalmente una respuesta inmune humoral, por lo que los animales inmunizados con PD10 se deben proteger a expensas de la respuesta de anticuerpos. Además de la neutralización, los anticuerpos pueden mediar otros mecanismos de la inmunidad contra el virus DEN como la ADCC (Falgout y cols, 1990; Laoprasopwattana y cols, 2007) y la activación del complemento (Yamanaka y cols, 2008). Independientemente de que la respuesta de anticuerpos IgG totales fue similar en los monos inmunizados con PD10 que resultaron protegidos de forma total o parcial después del reto, no se midieron otras funciones de estos anticuerpos aparte de la neutralización. La proteína E se expresa de forma íntegra en la membrana de las células infectadas por el virus DEN, lo que las hace blanco potencial de la ADCC. Se plantea que la ADCC puede controlar la replicación viral durante la fase temprana de la infección.

En un estudio prospectivo realizado en niños tailandeses, la actividad ADCC detectada en los plasmas colectados previo a la enfermedad correlacionó inversamente con la carga viral durante la infección secundaria subsecuente por el virus DEN 3 (Laoprasopwattana y cols, 2007). Por otra parte, se plantea que la actividad del complemento controla la capacidad amplificadora o neutralizante de los anticuerpos anti-DEN. Recientemente se demostró que la capacidad amplificadora de los anticuerpos monoclonales contra los serotipos 2 y 4, en concentraciones subneutralizantes, se elimina por la adición de los factores del complemento C1q y C3. La actividad amplificadora de estos anticuerpos monoclonales se redujo significativamente cuando la actividad hemolítica del complemento se encontraba en los niveles normales (Yamanaka y cols, 2008). La formación de inmunocomplejos entre la proteína E del virus DEN y los anticuerpos monoclonales puede activar el complemento, seguido por la formación del complejo de ataque a membrana C5b-C9 que puede actuar directamente sobre las partículas virales (Yamanaka y cols, 2008). Otra de las evidencias que apoya la actividad del complemento en la protección frente a la infección por los virus del DEN, es que los pacientes con FHD presentan una disminución en actividad hemolítica del complemento durante la fase aguda de la infección (Nishioka, 1974), en comparación con los de FD en los que la actividad del complemento no se altera (Shaio y cols, 1992).

La inmunidad mediada por células también participa en la protección frente a la infección por los virus del DEN (van Der Most y cols, 2000; Gil y cols, 2009). Previamente se demostró la presencia de un epitopo para células T en ratones dentro del dominio III de la proteína E (Khanam y cols, 2006b). No podemos descartar la estimulación de una respuesta de células T efectoras por la proteína PD10, debido a que la formación de agregados por las proteínas recombinantes se asocia a la inducción de una respuesta de linfocitos T citotóxicos en ratones (Speidel y cols, 1997). Similar a lo demostrado para PD5 (Lopez y cols, 2004), la proteína PD10 también forma agregados por la presencia de cisteínas libres en la estructura de la proteína P64k.

El estudio con la proteína recombinante PD10 permitió evaluar, además, la utilidad de los monos *M. fascicularis* en comparación con los *M. mulatta* de acuerdo al desarrollo de viremia después del reto viral con el virus DEN 1. La viremia en los monos *M. mulatta* resultó similar a la previamente publicada para el virus DEN 1 en esta especie, donde ésta varía de 2,8 a 7 días en dependencia de la cepa viral empleada, de la historia de pase de la misma y de los métodos de detección utilizados (Guirakhoo y cols, 2002; Eckels y cols, 2003; Guirakhoo y cols, 2004a; Guirakhoo y cols, 2004b; Simmons y cols, 2006; Blaney y cols, 2007; Freire y cols, 2007). A pesar de que en el experimento con DEN 1, los monos *M. mulatta* fueron más susceptibles a la infección que los monos *M. fascicularis*, la viremia en estos últimos se redujo debido a que el virus infeccioso no se detectó en uno ellos. No obstante, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, los monos *M. fascicularis* y los *M. mulatta* arrojaron conclusiones similares en cuanto a la inmunogenicidad y a la capacidad protectora inducida por PD10. La especie *M. fascicularis* se empleó previamente de manera satisfactoria para la evaluación de proteínas recombinantes de la envoltura de DEN 2 (Velzing y cols, 1999) y DEN 4 (Guzman y cols, 2003b), para la evaluación de virus quiméricos FA-DEN (Guirakhoo y cols, 2004a) y encefalitis equina venezolana-DEN (Chen y cols, 2007b), así como para la evaluación de virus vivos atenuados (Koraka y cols, 2007b). Tomando en consideración los elementos anteriores y el hecho de que la disponibilidad de los monos *M. mulatta* en Cuba es limitada, la especie *M. fascicularis* puede ser empleada para las evaluaciones de las proteínas recombinantes P64k-dominio III.

Los resultados de este acápite demuestran que la proteína recombinante de DEN 1 P64k-dominio III (PD10), similar a lo previamente demostrado para su homóloga del serotipo 2, induce una respuesta de anticuerpos neutralizantes en monos *M. fascicularis* y *M. mulatta* comparable a la generada por el virus DEN 1 completo. Se demuestra, además, la capacidad protectora de la inmunidad inducida por la proteína PD10 en ambas especies de mono, a través de la reducción de la viremia después del reto con el virus salvaje.

4.2. Respuesta inmune humoral en los monos *M. fascicularis* inmunizados con las proteínas recombinantes PD10 y PD5 tras el reto viral homólogo

Para considerar el uso de las proteínas recombinantes de DEN 1 y DEN 2 en estrategias de inmunización combinadas con cepas atenuadas de DEN, se evaluó la respuesta inmune humoral inducida después del reto viral en los monos *M. fascicularis* inmunizados con PD10 y PD5, como una evidencia de la capacidad de estas proteínas de sensibilizar al sistema inmune ante una dosis con el virus infectivo. La proteína PD5, similar a la proteína PD10, indujo anticuerpos neutralizantes y protección frente al reto viral en monos *M. fascicularis* (Hermida y cols, 2006). En este estudio se toma el virus infectivo como modelo de una dosis de virus vivo atenuado, candidatos actuales en desarrollo por la competencia. Se colectaron muestras de suero de los monos inmunizados con PD10 y PD5 después del reto con los virus DEN (DEN 1 o DEN 2 respectivamente) a intervalos de tiempo. La respuesta inmune humoral se estudió de acuerdo a la detección de anticuerpos IgG totales por ELISA y de su capacidad neutralizante mediante NRNP.

En la figura 4 se muestra la respuesta de anticuerpos IgG detectada después del reto viral con DEN 1 en los animales inmunizados con PD10 o con P64k. Los niveles de anticuerpos IgG anti-DEN 1 generados después del reto viral en los animales sensibilizados con PD10 fueron elevados, mientras que los animales inmunizados con la proteína P64k mostraron títulos inferiores. En el momento de la detección de los niveles máximos de anticuerpos (día 21 post reto) los títulos resultaron 16 veces superiores en los animales sensibilizados con PD10, con respecto a los detectados en los que recibieron P64k. La capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos después del reto viral en los monos inmunizados con PD10 también se reactivó eficientemente (tabla 6). Los monos sensibilizados con PD10 mostraron títulos de anticuerpos neutralizantes 12,7 veces superiores a los detectados en los monos inmunizados sólo con P64k, a los 60 días del reto con el virus DEN 1. Además, los títulos de anticuerpos neutralizantes detectados en los monos inmunizados previamente con PD10 se mantuvieron constantes entre los

días 30 y 60 después del reto viral, lo que evidencia la duración en el tiempo de la respuesta inmune inducida.

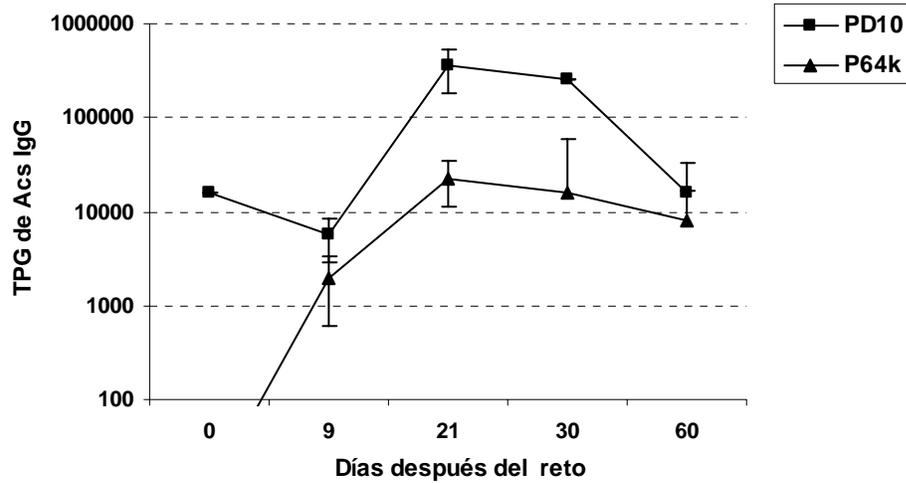


Figura 4. Títulos de anticuerpos IgG anti-dengue 1 detectados en los monos *M. fascicularis* inmunizados con PD10 después del reto viral con dengue 1. Los monos se inocularon con cuatro dosis de 0,1 mg de PD10 y se retaron con 10^6 ufp de la cepa DEN 1 Jamaica a los dos meses después. Los Acs IgG se detectaron por ELISA a la cepa DEN 1 Hawaii en las muestras tomadas periódicamente después del reto viral y se estimaron como la mayor dilución de suero que mostró un valor positivo en el ELISA. Se representa el inverso de los TPG de Acs \pm DS para cada grupo (n=2).

Tabla 6. Títulos de anticuerpos neutralizantes anti-dengue 1 detectados en los monos *M. fascicularis* inmunizados con PD10 o P64k después del reto con el virus dengue 1

Grupo	mono #	Días después del reto					
		0	9	21	30	60	
<i>M. fascicularis</i>	PD10	I	<10	400	9000	2200	1100
		II	54	250	3400	1300	10000
		TPG	16	316	5532	1691	3317
	P64k	I	<10	<10	<10	100	1000
		II	<10	<10	<10	31	68
		TPG	<10	<10	<10	56	261

Los monos se inocularon con cuatro dosis de 0,1 mg de PD10 y se retaron con 10^6 ufp de la cepa DEN 1 Jamaica dos meses después. Los títulos de Acs Nts se detectaron por NRNP a la cepa DEN 1 West Pacific en las muestras tomadas periódicamente después del reto viral y se estimaron como la dilución de suero que redujo en un 50% el número de placas virales. Se representa el inverso de los títulos de Acs Nts para cada mono y los TPG de Acs para cada grupo.

Para el serotipo 2, la respuesta de anticuerpos generada ante el reto viral en los monos inmunizados con la proteína PD5 o P64k se evaluó en comparación con los monos *M. fascicularis* que recibieron una dosis del virus DEN 2 y que se retaron con el mismo virus. Como se muestra en la figura 5, los niveles de anticuerpos IgG totales detectados por ELISA en los monos sensibilizados con PD5 se incrementaron rápidamente después del reto con el virus DEN 2 y a los 32 días, cuando se detectaron los títulos mayores, estos resultaron 32 veces superiores a los detectados en los animales controles inmunizados con P64k. Los anticuerpos neutralizantes también se reactivaron después del reto viral en los animales inmunizados con PD5 (tabla 7). Los títulos de anticuerpos IgG totales y los neutralizantes estimulados después del reto viral con DEN 2 fueron similares entre los monos inmunizados con PD5 (figura 5, tabla 7) y los inoculados con dos dosis del virus DEN 2 (figura 6, tabla 8). Con estos resultados se demuestra que la proteína recombinante P64k-dominio III del serotipo 2 sensibiliza al sistema inmune frente a la infección por el virus tan eficientemente como la inoculación de una dosis de virus DEN 2 infectivo.

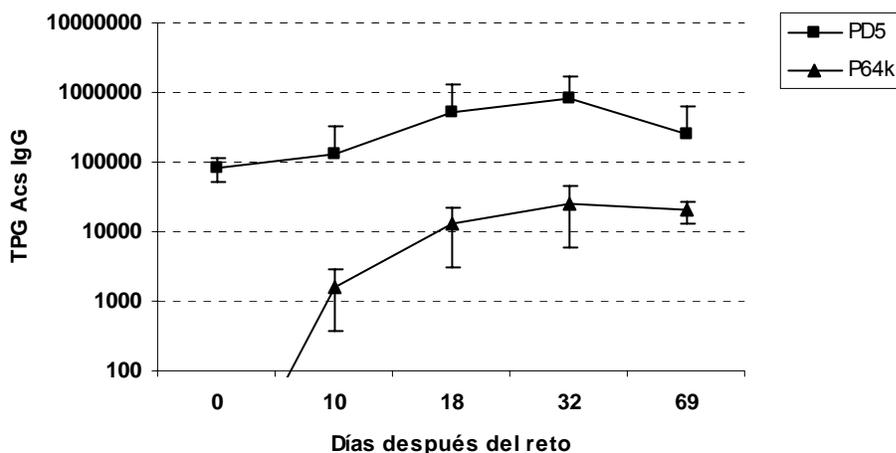


Figura 5. Títulos de anticuerpos IgG anti-dengue 2 detectados en los monos *M. fascicularis* inmunizados con PD5 después del reto viral con dengue 2. Los monos se inocularon con cuatro dosis de 0,1 mg de PD5 y se retaron con 10^5 ufp de DEN 2 A15 a los 45 días después. Los títulos de Acs IgG se evaluaron por ELISA a la cepa DEN 2 NGC en las muestras tomadas periódicamente después del reto viral y se estimaron como la mayor dilución de suero que mostró un valor positivo en el ELISA. Se representa el inverso de los TPG de Acs \pm DS para cada grupo (n=3).

Tabla 7. Títulos de anticuerpos neutralizantes anti-dengue 2 detectados en los monos *M. fascicularis* inmunizados con PD5 o P64k después del reto con el virus dengue 2

Grupo	mono#	Días después del reto					
		0	10	18	32	69	
<i>M. fascicularis</i>	PD5	I	<10	78	250	160	72
		II	16	22	460	78	24
		III	22	1280	2600	108	124
	TPG	12	130	669	110	60	
P64k	I	<10	<10	<10	<10	100	
	II	<10	<10	<10	<10	50	
	III	<10	<10	<10	<10	60	
	TPG	<10	<10	<10	<10	67	

Los monos se inocularon con cuatro dosis de 0,1 mg de PD5 o P64k y se retaron con 10^5 ufp de la cepa DEN 2 A15 a los 45 días después. Los títulos de Acs Nts se detectaron por NRNP frente a la cepa DEN 2 A15 en las muestras tomadas periódicamente después del reto viral y se estimaron como la dilución de suero que redujo en un 50% el número de placas virales. Se representa el inverso de los títulos de Acs Nts para cada mono y los TPG de Acs para cada grupo.

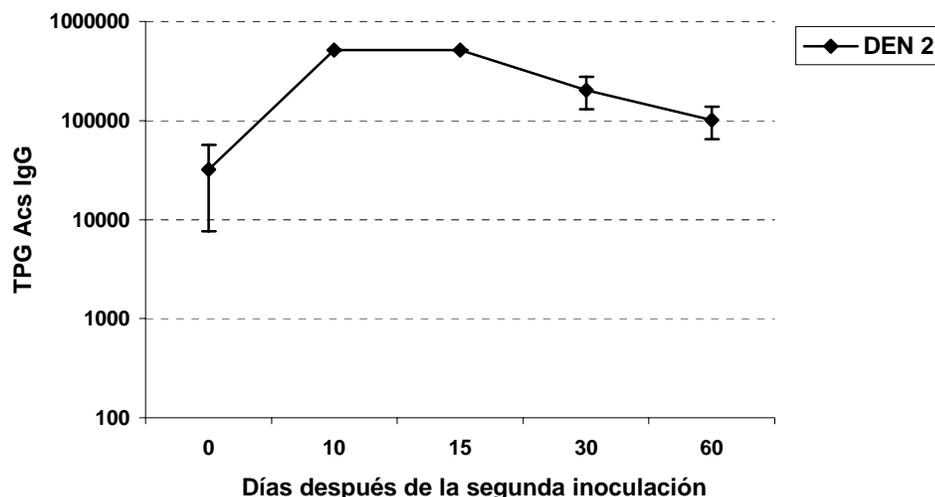


Figura 6. Títulos de anticuerpos IgG anti-dengue 2 detectados en los monos *M. fascicularis* después de la segunda inoculación con el virus dengue 2. Los monos (n=3) se inocularon con 10^4 ufp de la cepa DEN 2 A15 y un año después estos monos se infectaron nuevamente con 10^4 ufp de la cepa DEN 2 A15. Los títulos de Acs IgG se detectaron por ELISA a la cepa DEN 2 A15 en los sueros colectados periódicamente después de la segunda inoculación viral y se estimaron como la mayor dilución que mostró un valor positivo. Se representa el inverso de los TPG Acs \pm DS.

Tabla 8. Títulos de anticuerpos neutralizantes anti-dengue 2 detectados en los monos *M. fascicularis* después de la segunda inoculación con el virus dengue 2

Grupo	mono #	Días después del reto				
		0	10	15	30	60
<i>M. fascicularis</i> DEN 2	I	54	200	280	150	150
	II	28	190	350	260	56
	III	92	250	500	400	150
	TPG	52	212	366	250	108

Los monos (n=3) se inocularon con 10^4 ufp de la cepa DEN 2 A15 y un año después estos monos se infectaron nuevamente con 10^4 ufp de la cepa DEN 2 A15. Los títulos de Acs Nts se detectaron por NRNP a la cepa DEN 2 A15 en los sueros tomados periódicamente después de la segunda inoculación viral y se estimaron como la dilución de suero que redujo en un 50% el número de placas virales. Se representa el inverso de los títulos de Acs Nts para cada mono y el TPG de Acs para cada grupo.

Los animales inmunizados con PD5 mostraron una reactivación menor de la respuesta de anticuerpos después del reto viral en comparación con los inmunizados con PD10. Sin embargo, la viremia detectada por RT-PCR en los grupos retados con DEN 1 o DEN 2 fue similar con un día como media para los monos previamente inmunizados con PD10 (como se muestra en el acápite 1) o PD5 (como se publicó previamente, Hermida y cols 2006). Además de la naturaleza del serotipo, la principal diferencia entre estos dos grupos fue la dosis de virus infectivo empleado en el reto viral, con 10^6 ufp para DEN 1 y 10^5 ufp para DEN 2. Por tanto, es posible que la magnitud en que se reactiva la respuesta de memoria ante la dosis con el virus infectivo dependa de la dosis viral del inóculo, aún cuando la viremia en los monos no se incrementó con el uso de 10^6 ufp. Previamente se demostró que la inoculación de dosis virales elevadas de DEN 1 en monos (10^4 - 10^6 ufp) no incrementa el número de días virémicos sino que sólo hace que la detección de ésta sea más temprana (Markoff y cols, 2002). Para el serotipo 2 también se demostró que la inoculación de dosis virales entre 10^3 - 10^5 ufp provoca viremias con duraciones similares, y que con la dosis viral más baja sólo se retarda el desarrollo de la viremia (Martin y cols, 2009).

El hecho de que las proteínas recombinantes PD10 y PD5 induzcan protección parcial en monos de acuerdo a la detección de ARN viral por RT-PCR y que por tanto el virus aún se replique a bajos niveles en estos animales, puede considerarse una ventaja para su uso en estrategias de inmunización combinadas con cepas atenuadas. La protección parcial se asocia al desarrollo de una respuesta de anticuerpos de memoria fuerte después del reto viral en los monos inmunizados con proteínas recombinantes de la envoltura del virus DEN (Velzing y cols, 1999; Guzman y cols, 2003b; Putnak y cols, 2005). Sin embargo, cuando la viremia se reduce totalmente por lo general no se desarrolla una respuesta de memoria de anticuerpos, de acuerdo a los estudios de inmunización secuencial de DEN en monos (Halstead y cols, 1973). Asimismo, la posibilidad de reactivar la respuesta de anticuerpos a los dos meses de la última inmunización con las proteínas recombinantes permite el empleo de esquemas condensados que reduzcan el tiempo entre las dosis de inmunización. La inmunización con

candidatos atenuados requiere del empleo de dos o más dosis para lograr una respuesta inmune tetravalente y estas deben estar espaciadas por al menos seis meses para lograr la reactivación eficiente de la respuesta inmune (Sabchareon y cols, 2004; Guy y Almond, 2008; Simasathien y cols, 2008). En estos seis meses entre la primera y la segunda dosis, los individuos vacunados presentan anticuerpos a DEN pero esta respuesta no es protectora frente a los cuatro serotipos, por lo que son sensibles a desarrollar la forma severa de la enfermedad en caso de infección por DEN. Por tanto, es fundamental el establecimiento de estrategias de inmunización que reduzcan este período de sensibilización. Al mismo tiempo, la inmunidad inducida por las proteínas recombinantes puede disminuir las reacciones adversas provocadas por las cepas atenuadas de DEN en humanos, que constituyen la principal limitante de estos candidatos en los estudios de fase clínica (Whitehead y cols, 2007).

Las estrategias de inmunización que combinan candidatos basados en sistemas replicativos y no replicativos se emplean para inducir una respuesta inmune humoral y celular balanceada. Los antígenos proteicos son procesados por las células presentadoras de antígenos profesionales y presentados a los linfocitos T asociados primariamente con las moléculas MHC clase II que activan linfocitos T CD4+ asociados principalmente con una respuesta inmune humoral. Por el contrario, los sistemas replicativos se procesan por la vía endógena de las células presentadoras de antígenos y se presentan en el contexto de las moléculas MHC clase I que estimulan fundamentalmente una respuesta inmune mediada por células (Janeway y cols, 2005). Por tanto, la combinación de las proteínas recombinantes P64k-dominio III, dirigidas principalmente a la inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes, con cepas atenuadas de dengue puede estimular además una respuesta inmune efectora mediada por células.

La inducción de una respuesta humoral y celular balanceada a través de la combinación de proteínas recombinantes que contienen al dominio III de la proteína E con vacunas de ADN se demostró previamente en el modelo de ratón. La proteína recombinante que contiene al dominio III de la proteína E del virus DEN 2 fusionado a la MBP de *E.coli* se evaluó en ratones en combinación con una

vacuna de ADN que expresa los genes prM y E de este mismo serotipo. A diferencia de la inmunización con la proteína recombinante o con el ADN solo, que indujeron anticuerpos IgG1 e IgG2a respectivamente, algunas de las combinaciones empleadas lograron inducir ambas subclases de IgG (Simmons y cols, 2001b). Sin embargo, la combinación de estos dos candidatos en monos, y además de un virus DEN 2 inactivado, no mostró resultados satisfactorios. Los monos inmunizados con las diferentes combinaciones de proteína recombinante dominio III-MBP, ADN o virus inactivado no redujeron significativamente la viremia ante el reto con el virus DEN 2 (Simmons y cols, 2006). Otra de las estrategias de inmunización secuencial publicadas incluye la combinación de un adenovirus recombinante que expresa al dominio III de la proteína E, junto a un plásmido que codifica para estos mismos genes. La combinación de estos dos antígenos resultó en la inducción de anticuerpos neutralizantes específicos contra el serotipo 2 y de una respuesta de células T de tipo Th1 en ratones (Khanam y cols, 2006b). Luego estos mismos autores desarrollaron una estrategia similar pero con adenovirus recombinantes que expresan los dominios III de los serotipos 2 y 4 en combinación con un plásmido que codifica para el mismo antígeno bivalente quimérico. Los resultados mostraron la inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes y de células T equivalentes para ambos serotipos en ratones, lo que apoya la potencialidad de este enfoque para el desarrollo de una vacuna tetravalente (Khanam y cols, 2007). También se evaluó en ratones un candidato tetravalente de ADN, que incluye los genes prM y E del virus, co-inmunizado con partículas extracelulares de DEN 2 o con la vacuna inactivada de la EJ (Konishi y cols, 2006). Estos regímenes de inmunización incrementaron la producción de anticuerpos neutralizantes y confirieron protección en los animales frente al desarrollo de viremia artificial después de la inoculación intravenosa con el virus DEN 2 (Imoto y Konishi, 2007). No obstante, la efectividad de estos esquemas de inmunización combinados aún debe ser demostrada en monos como el modelo animal más cercano al humano.

La única estrategia de inmunización secuencial descrita en monos hasta el momento con resultados satisfactorios se basó en el empleo de partículas virales

del virus de la encefalitis equina venezolana, que expresan los genes prM y E del virus DEN 1, combinadas con una vacuna de ADN que codifica para estos mismos genes. Los monos inmunizados con este régimen de inmunización desarrollaron anticuerpos neutralizantes y redujeron totalmente la viremia después del reto viral (Chen y cols, 2007b). No obstante, ninguno de los enfoques de inmunización secuencial publicados hasta el momento se basa en la combinación de proteínas recombinantes con cepas virales atenuadas de DEN.

El dominio III de la proteína E, expresado como una proteína recombinante en *Drosophila* S2, se empleó con anterioridad para reactivar la respuesta inmune inducida en ratones por el candidato que emplea a la vacuna del sarampión para la expresión del dominio III de la proteína E fusionado al ectodominio de la proteína M del virus DEN 1 (MV-EDIII-EctoM) (Brandler y cols, 2007). Como resultado, los ratones inmunizados con MV-EDIII-EctoM en el día cero e inoculados seis meses después con la proteína recombinante que contiene al dominio III de DEN 1 incrementaron significativamente los títulos de anticuerpos IgG totales y neutralizantes al virus DEN 1 (Brandler y cols, 2007). Estos datos muestran que el dominio III de la proteína E puede también reactivar la respuesta de memoria de anticuerpos a DEN.

Los resultados de este acápite demuestran la capacidad de las proteínas recombinantes P64k-dominio III de DEN 1 y DEN 2 de sensibilizar el sistema inmune ante la infección por el virus DEN. Estas evidencias apoyan el uso de esquemas de inmunización combinados que sensibilicen al sistema inmune con las proteínas recombinantes y lo reactiven con cepas atenuadas, como estrategias para incrementar la duración de la respuesta inmune inducida por las proteínas recombinantes y para implementar esquemas de inmunización más cortos y seguros con las cepas atenuadas.

4.3. Reactividad cruzada de los anticuerpos inducidos por las proteínas quiméricas PD10 y PD5 en monos *M. fascicularis* a los cuatro serotipos y a cepas de los virus homólogos

4.3.1. Capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por PD10 y PD5 en monos frente a cepas de genotipos diferentes

Teniendo en cuenta que los anticuerpos neutralizantes son considerados el principal marcador de inmunidad protectora para los virus del DEN (Hombach y cols, 2007), la inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes amplia debe ser uno de los objetivos principales de los candidatos vacunales. Existen algunas evidencias de que la respuesta de anticuerpos a un genotipo del virus DEN no siempre es neutralizante contra el resto de las cepas de este serotipo. Previamente se demostró que la antigenicidad y la inmunogenicidad de las construcciones genéticas que contienen al dominio III de la proteína E fusionado a la proteína P64k varían en dependencia de los cambios aminoacídicos en esta región (Zulueta y cols, 2006). De dos construcciones genéticas de DEN 3 (dominio III-P64k) desarrolladas con cepas que muestran cuatro variaciones aminoacídicas en la región correspondiente al dominio III, sólo una de ellas indujo niveles significativos de anticuerpos neutralizantes y de protección frente al reto intracraneal con el virus infeccioso en ratones (Zulueta y cols, 2006). Por otra parte, los anticuerpos neutralizantes inducidos por la infección natural de humanos con cepas de DEN 3 de genotipo III mostraron un menor reconocimiento frente a cepas del genotipo IV de este serotipo (Alvarez y cols, 2008). Los estudios realizados con anticuerpos monoclonales también demostraron que cambios específicos en aminoácidos correspondientes al dominio III de la proteína E resultan en la pérdida de la unión de los anticuerpos monoclonales neutralizantes (Lin y cols, 1994; Hiramatsu y cols, 1996; Sukupolvi-Petty y cols, 2007). Además, se demostró que la capacidad neutralizante de los anticuerpos monoclonales depende de la virulencia de las cepas y que específicamente las cepas más virulentas resultan menos neutralizadas (Falconar, 2008).

Para demostrar que las proteínas recombinantes de DEN 1 y DEN 2 inducen una respuesta inmune humoral contra diferentes genotipos de estos serotipos, se evaluó la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos por PD10 y PD5 en los monos *M. fascicularis*, frente a diferentes cepas de los serotipos 1 y 2, respectivamente. Los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por las proteínas recombinantes se compararon con los inducidos después de la infección de los virus DEN 1 y DEN 2 en los monos *M. fascicularis*.

En la figura 7 se presentan los TPG de anticuerpos neutralizantes detectados en los grupos de monos *M. fascicularis* inmunizados con la proteína recombinante PD10 o inoculados con el virus DEN 1, frente a dos cepas de DEN 1 que pertenecen a los genotipos IV y V de este serotipo, de acuerdo a la clasificación descrita previamente (Laille y Roche, 2004). Los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos tanto frente a la inmunización con la proteína PD10 como a la infección por el virus DEN 1, mostraron un grado elevado de reconocimiento frente a los dos genotipos estudiados del serotipo 1.

El grupo de animales inoculados con el virus DEN 1 mostró TPG de anticuerpos neutralizantes ligeramente superiores frente a la cepa DEN 1 Jamaica que fue la empleada para la inoculación de estos animales. En este caso los TPG de anticuerpos a la cepa Jamaica fueron 1,7 veces superiores a los obtenidos frente a la cepa DEN 1 West Pacific. Sin embargo, los títulos de anticuerpos neutralizantes desarrollados en los animales inmunizados con la proteína PD10 resultaron 7 veces superiores frente a la cepa de genotipo IV, a pesar de que el dominio III que contiene esta construcción genética se corresponde con la cepa DEN 1 Jamaica (genotipo V). A diferencia de la infección con el virus DEN 1, donde la proteína E completa contribuye a la inducción de anticuerpos neutralizantes, en la proteína PD10 influyen sólo los sitios antigénicos del dominio III. Los dominios III de las cepas DEN 1 Jamaica y DEN 1 West Pacific difieren por una sustitución de isoleucina por treonina en la posición 359 de la proteína E (Laille y Roche, 2004). La treonina de la posición 359 es un residuo conservado entre los serotipos 1, 2 y 3, y específicamente los mutantes de DEN 2 de treonina por isoleucina en la posición 359 disminuyeron la afinidad de unión de anticuerpos monoclonales a

este sitio (Sukupolvi-Petty y cols, 2007). Recientemente Volk y cols (2007) demostraron que la afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales contra el dominio III está relacionada a la carga y a la hidrofobicidad de los aminoácidos que conforman los epitopos. Los estudios con anticuerpos monoclonales también demostraron que las mutaciones que implican cambios estructurales y bioquímicos dentro de los sitios antigénicos del dominio III correlacionan con diferencias en la afinidad de unión de los anticuerpos y en la capacidad neutralizante de estos (Matsui y cols, 2009). La sustitución de treonina-359 en DEN 1 West Pacific por Isoleucina-359 en DEN 1 Jamaica resulta en un cambio de un aminoácido polar a uno no polar, lo que pudiera disminuir la afinidad de unión de los anticuerpos neutralizantes a este sitio y explicar el menor reconocimiento por neutralización de la cepa DEN 1 Jamaica.

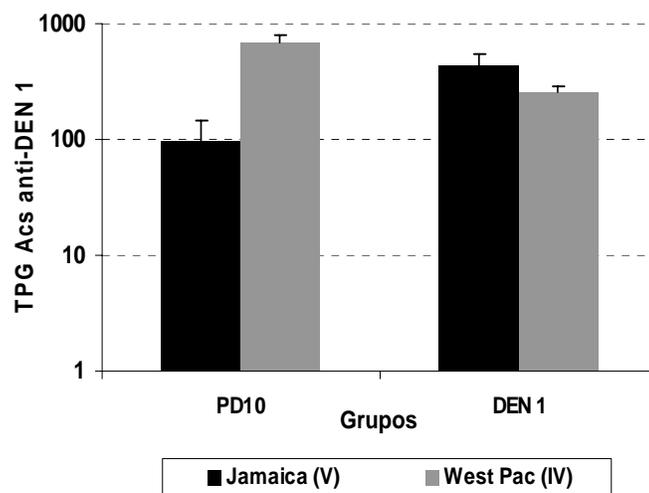


Figura 7. Títulos de anticuerpos neutralizantes en los sueros de los monos *M. fascicularis* inmunizados con PD10 o inoculados con el virus dengue 1 frente a cepas de dos genotipos del serotipo 1. Los monos se inmunizaron cuatro dosis de 0,1 mg de PD10 (PD10, n=2) o se inocularon con 10^6 ufp de la cepa DEN 1 Jamaica (DEN 1, n=2) y los sueros se colectaron a los 15 días de la cuarta dosis o a los 60 días de la infección, respectivamente. Los Acs Nts se evaluaron por NRNP frente a las cepas DEN 1 West Pacific (genotipo IV) y DEN 1 Jamaica (genotipo V). Se representa el inverso de los TPG de Acs Nts \pm DS para cada grupo, estimados como la dilución de suero que redujo en un 50% el número de placas virales.

Seguidamente se evaluaron los anticuerpos neutralizantes en los sueros de los monos inmunizados con PD5 o inoculados con el virus DEN 2, frente a cepas de los genotipos asiático y americano de este serotipo de acuerdo a la clasificación descrita previamente (Rico-Hesse, 2007). Como se muestra en la figura 8, tanto los sueros de los animales inmunizados con PD5 como los de los animales infectados con DEN 2, mostraron TPG de anticuerpos neutralizantes elevados a las tres cepas estudiadas.

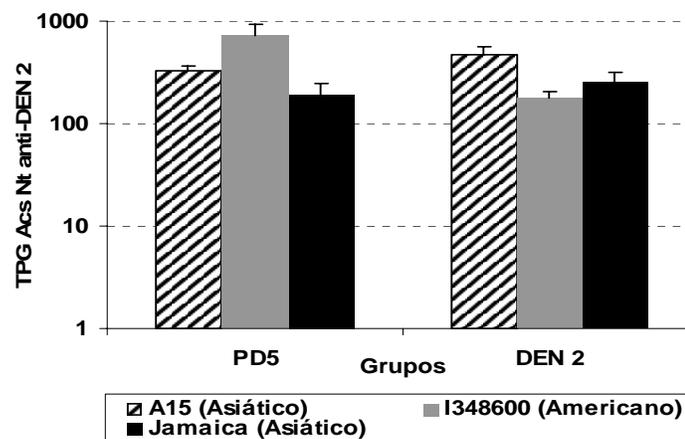


Figura 8. Títulos de anticuerpos neutralizantes en los sueros de los monos *M. fascicularis* inmunizados con PD5 o inoculados con el virus dengue 2 frente a cepas de dos genotipos del serotipo 2. Los monos recibieron cuatro dosis de 0,1 mg de PD5 (PD5, n=3) o 10^5 ufp de la cepa DEN 2 A15 (DEN 2, n=3) y los sueros se colectaron a los 15 días de la cuarta dosis o a los 60 días de la infección, respectivamente. Los Acs Nts se evaluaron por NRNP a las cepas DEN 2 A15, DEN 2 Jamaica (ambas de genotipo asiático) y DEN 2 I348600 (genotipo americano) y los títulos se estimaron como la dilución de suero que redujo en un 50% el número de placas virales. Se representa el inverso de los TPG de Acs Nts \pm DS para cada grupo.

Los TPG de anticuerpos neutralizantes a la cepa DEN 2 A15 (cepa empleada para la inoculación de los animales) en los monos inoculados con el virus DEN 2 resultaron 1,8 y 2,6 veces superiores a los obtenidos frente a las cepas DEN 2 Jamaica e I348600 respectivamente, lo que evidencia un comportamiento similar al observado en los animales inoculados con el virus DEN 1. Sin embargo, los monos inmunizados con PD5 mostraron TPG de anticuerpos neutralizantes cuatro

veces superiores a la cepa de genotipo americano, a pesar de que la construcción genética de esta proteína se realizó con la cepa DEN 2 Jamaica. Aún cuando las diferencias en los TPG de anticuerpos a las tres cepas en los animales inmunizados con PD5 fueron menos marcadas que las detectadas en los animales inmunizados con PD10, los resultados muestran un patrón similar para ambas proteínas recombinantes en este modelo animal.

A partir de los estudios realizados en monos y en humanos, se postuló que las cepas de DEN 2 de genotipo americano pueden ser neutralizadas más fácilmente que las de genotipo asiático por la inmunidad homotípica y heterotípica, y esto se relacionó a la menor patogenicidad de las cepas americanas durante las infecciones secundarias heterotípicas (Kochel y cols, 2002; Kochel y cols, 2005). Particularmente, los sueros de monos inoculados con una cepa de DEN 2 de genotipo asiático muestran títulos de anticuerpos neutralizantes superiores frente a la cepa de genotipo americano a los 90 días de la infección (Kochel y cols, 2005). Tras la infección natural por DEN 2 en humanos, los títulos de anticuerpos neutralizantes resultan significativamente superiores frente a las cepas de genotipo americano comparados con los obtenidos frente a las cepas asiáticas (Kochel y cols, 2002). En la región correspondiente al dominio III de la proteína E, los genotipos asiático y americano muestran un cambio en el aminoácido 390 de asparagina por aspartato que se correlaciona con la virulencia de estas cepas (Leitmeyer y cols, 1999). El aminoácido 390 está localizado en la superficie lateral del dímero de la proteína E que contiene residuos que determinan la virulencia de varios flavivirus (Rey y cols, 1995; Leitmeyer y cols, 1999). El residuo E-390 está localizado en una región altamente hidrofílica y se conoce que la carga de los residuos influye en la unión de los anticuerpos a los sitios antigénicos (Volk y cols, 2007). Aún cuando la asparagina y el aspartato tienen el mismo valor en cuanto a hidrofobicidad, el cambio de un aminoácido neutro en el genotipo asiático a uno ácido en el americano pudiera incrementar la neutralización del virus.

La capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos en humanos por el candidato vacunal quimérico FA-DEN 2, que contiene los genes prM y E del

serotipo 2 sobre el esqueleto de la cepa atenuada de FA, también se evaluó frente a cepas de varios genotipos de DEN 2 (Guirakhoo y cols, 2006). Los títulos de anticuerpos detectados a los 30 días de la inmunización resultaron similares a las cepas de genotipo asiático y americano. Sin embargo, los títulos de anticuerpos neutralizantes a una de las cepas asiáticas y a la americana disminuyeron significativamente a los seis meses de la inmunización (Guirakhoo y cols, 2006), lo que evidencia la necesidad de evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos a cepas diferentes en el tiempo.

Los resultados obtenidos en este acápite demuestran que los anticuerpos neutralizantes inducidos por las proteínas recombinantes PD10 y PD5 reconocen cepas de genotipos diferentes, aún cuando algunas cepas resultaron neutralizadas más eficientemente que las cepas vacunales homólogas.

4.3.2. Reactividad cruzada de los anticuerpos IgG totales inducidos por PD10 y PD5 en monos a los cuatro serotipos del virus

Los niveles de anticuerpos de reactividad cruzada desarrollados después de la vacunación constituyen un aspecto de importancia ya que estos pudieran amplificar las infecciones naturales posteriores a la vacunación (Guzman y cols, 1991). Para evaluar la reactividad cruzada de los anticuerpos inducidos por las proteínas recombinantes PD10 y PD5 después de su inmunización en los monos *M. fascicularis*, se detectaron los títulos de anticuerpos IgG totales a los cuatro serotipos del virus mediante ELISA. Los títulos de anticuerpos de reactividad cruzada inducidos por las proteínas recombinantes se compararon con los inducidos después de la infección de los virus DEN 1 y DEN 2 en los monos *M. fascicularis*. Los anticuerpos se evaluaron mediante la técnica de ELISA, teniendo en consideración que la misma es capaz de mostrar los índices mayores de reactividad cruzada de manera semicuantitativa.

En la figura 9 se muestran los títulos de anticuerpos a los cuatro serotipos detectados por ELISA en los sueros de los monos inmunizados con PD10 o

inoculados con el virus DEN 1. Los títulos de anticuerpos inducidos después de la inmunización con la proteína recombinante PD10 resultaron superiores al serotipo homólogo (DEN 1), mientras que en los monos infectados con DEN 1 estos fueron similares a los cuatro serotipos.

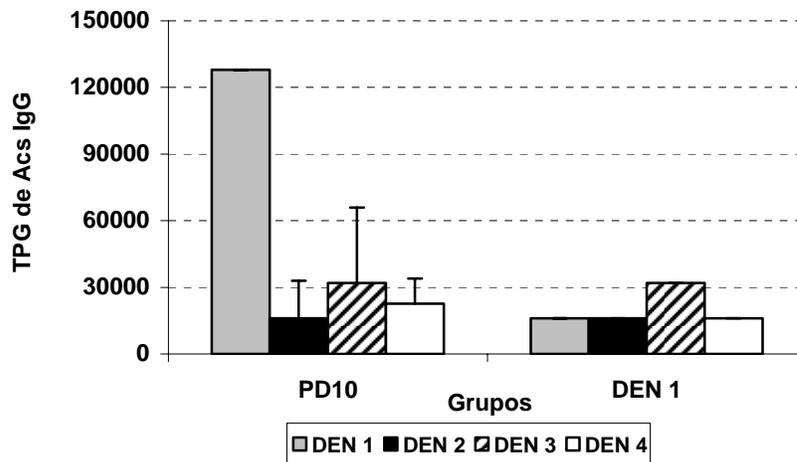


Figura 9. Títulos de anticuerpos IgG a los cuatro serotipos en los sueros de los monos *M. fascicularis* inmunizados con la proteína recombinante PD10 o infectados con el virus dengue 1. Los monos recibieron cuatro dosis de 0,1 mg de PD10 (n=2) o 10^6 ufp de DEN 1 Jamaica (n=2) y los sueros se colectaron a los 15 días de la cuarta dosis y a los 60 días de la inoculación viral, respectivamente. Los Acs IgG se detectaron por ELISA a los cuatro serotipos (DEN 1-DEN 4) y los títulos se estimaron como la mayor dilución que mostró un valor positivo. Se representa el inverso de los TPG de Acs \pm DS por grupo.

Los monos inmunizados con la proteína PD5 mostraron un comportamiento similar al observado con la proteína PD10 (figura 10). Los títulos de anticuerpos inducidos por PD5 resultaron superiores frente al serotipo 2, mientras que los títulos de anticuerpos inducidos por el virus DEN 2 fueron similares a los cuatro serotipos.

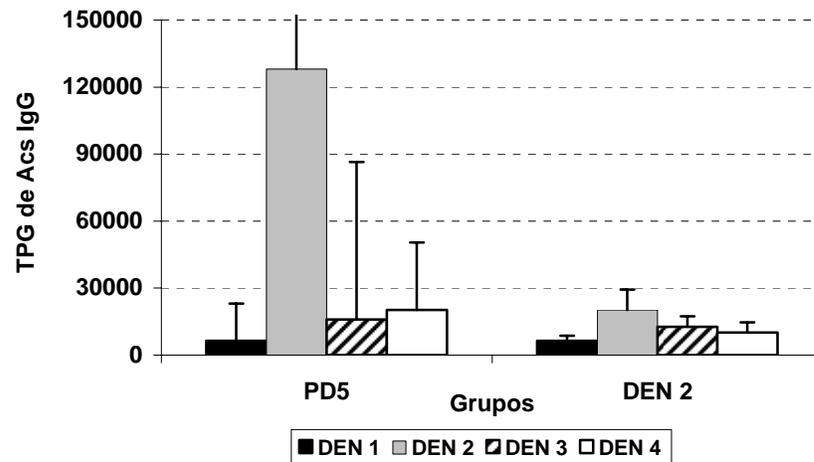


Figura 10. Títulos de anticuerpos IgG a los cuatro serotipos en los sueros de los monos *M. fascicularis* inmunizados con la proteína recombinante PD5 o infectados con el virus dengue 2. Los monos recibieron cuatro dosis de 0,1 mg de PD5 (n=3) o 10^5 ufp de la cepa DEN 2 A15 (n=3) y los sueros se colectaron a los 15 días de la cuarta dosis y a los 60 días de la inoculación viral, respectivamente. Los Acs IgG a los cuatro serotipos (DEN 1-DEN 4) se detectaron por ELISA y los títulos se estimaron como la mayor dilución que mostró un valor positivo. Se representa el inverso de los TPG de Acs \pm DS por grupo.

Este estudio constituye la primera evaluación de la reactividad cruzada de los anticuerpos inducidos por las proteínas recombinantes basadas en el dominio III de la proteína E en el modelo de monos. Las evidencias previas sobre la especificidad elevada de la respuesta inmune inducida por el dominio III de la proteína E provienen de la evaluación en ratones de los candidatos vacunales basados en este sitio (Simmons y cols, 1998; Simmons y cols, 2001a; Khanam y cols, 2006a; Khanam y cols, 2007). Los primeros datos de este tipo se obtuvieron de la evaluación de las proteínas recombinantes dominio III-MBP, donde los títulos de anticuerpos inducidos en ratones por cada una de las proteínas correspondientes a los cuatro serotipos resultaron al menos cuatro veces superiores al serotipo homólogo (Simmons y cols, 2001a). Un antígeno bivalente de DEN, que contiene a los dominios III de los serotipos 2 y 4 fusionados de manera secuencial, indujo también una respuesta de anticuerpos altamente específica a estos dos serotipos en ratones (Khanam y cols, 2006a). Además de la

inmunización con proteínas recombinantes, se demostró que la combinación de un adenovirus recombinante que expresa los dominios III de DEN 2 y DEN 4 como un antígeno bivalente, seguida por la estimulación con un vector plasmídico que expresa el mismo antígeno, induce títulos de anticuerpos significativamente superiores a los serotipos 2 y 4 en ratones (Khanam y cols, 2007).

La respuesta de anticuerpos inducida por las proteínas recombinantes PD10 y PD5 en el modelo de ratón también resultó altamente específica al serotipo homólogo (datos no mostrados). Los títulos de anticuerpos inducidos por estas proteínas fueron significativamente superiores frente a los serotipos homólogos en cada caso. Sin embargo, mientras que los títulos de anticuerpos a los serotipos homólogos fueron similares en el modelo de ratón y en el de mono, los niveles de anticuerpos con reactividad cruzada fueron superiores en el modelo de mono. Teniendo en cuenta que la dominancia antigénica es específica de cada especie, es posible que las diferencias entre ambos modelos puedan ser explicadas por las formas de procesamiento antigénico por parte del sistema inmune en cada una de ellas.

Los resultados obtenidos en este acápite demuestran que las proteínas recombinantes PD10 y PD5 inducen una respuesta de anticuerpos mayoritaria contra los serotipos 1 y 2, respectivamente. No obstante, por la significación que pudieran tener los anticuerpos con reactividad cruzada en el desarrollo de las formas severas de la enfermedad durante las infecciones posteriores a la vacunación, la implicación de estos en la ADA debe ser estudiada.

4.4. Capacidad amplificadora de los sueros inmunes a dengue 1 frente a cepas de dengue 2 de los genotipos asiático y americano

En las infecciones naturales en humanos, la inmunidad previa a DEN 1 constituye un factor de riesgo para el desarrollo de la FHD frente una infección siguiente por cepas de DEN 2 del genotipo asiático (no así para el genotipo americano) (Guzman y cols, 1991; Kochel y cols, 2002; Guzman y cols, 2007); mientras que la inmunidad a DEN 2 no está asociada al desarrollo de enfermedad severa durante las infecciones siguientes (Alvarez y cols, 2006). Para analizar la posible

participación de los anticuerpos de reactividad cruzada inducidos por la proteína PD10 en los monos *M. fascicularis* en la amplificación de las infecciones siguientes a la vacunación, se evaluó su capacidad amplificadora frente a cepas de DEN 2 de los genotipos asiático y americano, en células monocíticas humanas (K562). Los niveles de amplificación obtenidos con los sueros de los animales inmunizados con la proteína PD10 se compararon con los alcanzados por los sueros de los monos *M. fascicularis* que se infectaron con DEN 1, así como también con sueros humanos inmunes al virus DEN 1 para los cuales se conoce su capacidad amplificadora frente a DEN 2. Como control negativo de amplificación se emplearon sueros humanos inmunes a DEN 2, los cuales no deben amplificar la infección homotípica.

Inicialmente evaluamos el reconocimiento de los sueros inmunes a DEN 1 específicamente a las cepas DEN 2 A15 y DEN 2 I348600 por ELISA. Anteriormente se demostró que los anticuerpos inducidos por la inmunización con la proteína PD10 o por la inoculación con el virus DEN 1 reaccionaban de forma cruzada con el virus DEN 2 por ELISA pero con la cepa DEN 2 NGC. Como se muestra en la figura 11, todos los sueros inmunes a DEN 1 mostraron títulos de anticuerpos IgG totales anti-DEN 2 A15 y anti-DEN 2 I348600 superiores a 1/5 000.

Antes de los ensayos de amplificación viral también se determinaron los títulos de anticuerpos heterotípicos neutralizantes a las cepas DEN 2 A15 y DEN 2 I348600 en los sueros inmunes a DEN 1 de mono y de humano, para confirmar las diluciones en que estos se encontraban en concentraciones subneutralizantes. Como se muestra en la figura 12, en los sueros de monos inmunizados con la proteína PD10 (que muestran una respuesta de anticuerpos neutralizantes altamente específica al serotipo homólogo) y también en los sueros de monos inoculados con el virus DEN 1, los títulos de anticuerpos neutralizantes frente al virus DEN 2 de ambos genotipos son menores a 1/10. Los sueros humanos mostraron títulos de anticuerpos neutralizantes sobre el límite de detección frente

a la cepa de genotipo asiático (1/10) y ligeramente superiores frente a la cepa de genotipo americano. El hecho de que las cepas de genotipo americano son neutralizadas a niveles mayores que las asiáticas por parte de los anticuerpos anti-DEN 1 se observó previamente en los sueros de pacientes infectados primariamente por virus DEN 1 durante la epidemia de Perú de los años 1990-91 (Kochel y cols, 2002) y en los sueros de monos *Aotus nancymae* infectados experimentalmente con el virus DEN 1 (Kochel y cols, 2005). No obstante, ya a la dilución 1/100 todos los sueros se encontraban en concentraciones subneutralizantes.

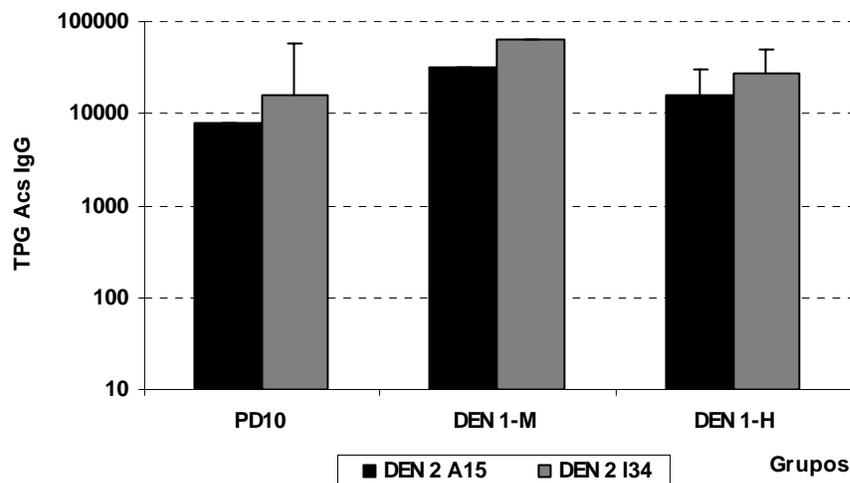


Figura 11. Títulos de anticuerpos IgG a las cepas DEN 2 A15 y DEN 2 I348600 en los sueros inmunes a DEN 1. Los monos *M. fascicularis* recibieron cuatro dosis de 0,1 mg de PD10 (PD10, n=2) o 10^6 ufp de DEN 1 Jamaica (DEN 1-M, n=2) y los sueros se colectaron a los 15 días de la cuarta dosis y a los 60 días de la inoculación viral, respectivamente. Los sueros humanos se colectaron de individuos inmunes a DEN 1 a los 20 años de la infección (DEN 1-H, n=4). Los Acs IgG se detectaron por ELISA a las cepas DEN 2 A15 y DEN 2 I348600 y los títulos se estimaron como la mayor dilución que mostró un valor positivo. Se representa el inverso de los TPG de Acs \pm DS por grupo.

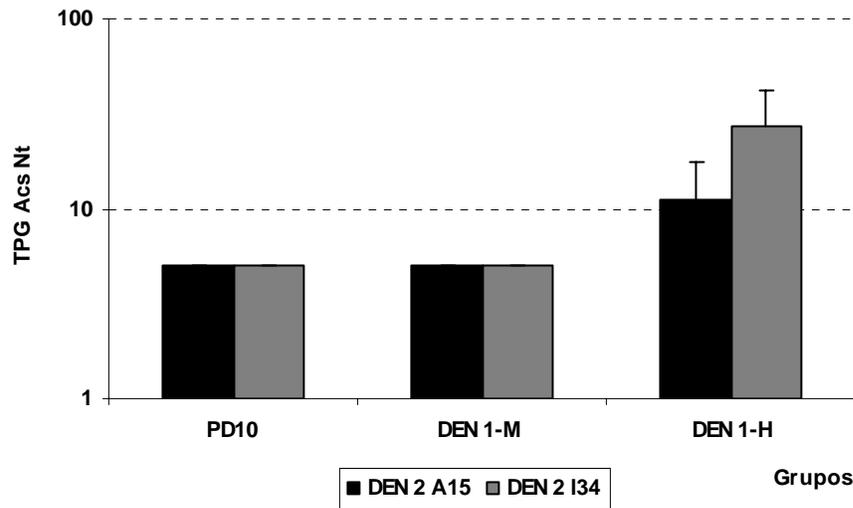


Figura 12. Títulos de anticuerpos neutralizantes a las cepas DEN 2 A15 y DEN 2 I348600 en los sueros inmunes a DEN 1. Los monos *M. fascicularis* recibieron cuatro dosis de 0,1 mg de PD10 (PD10, n=2) o 10^6 ufp de DEN 1 Jamaica (DEN 2-M, n=2) y los sueros se colectaron a los 15 días de la cuarta dosis y a los 60 días de la inoculación viral, respectivamente. Los sueros humanos se colectaron de individuos inmunes a DEN 1 a los 20 años de la infección (DEN 1-H, n=4). Los Acs Nts se evaluaron por NRNP a las cepas DEN 2 A15 y DEN 2 I348600 y los títulos se estimaron como la dilución de suero que redujo en un 50% el número de placas virales. Se representa el inverso de los TPG de Acs Nts \pm la DS para cada grupo. Los títulos de Acs Nt $< 1/10$ se consideran negativos.

La ADA se realizó con los sueros inmunes a DEN 1 diluidos entre 1/10-1/100 000. Sin embargo, estos amplificaron la infección por las cepas de DEN 2 en el rango de 1/100-1/1000, lo que apoya las referencias previas acerca de que la amplificación es dependiente de la concentración de anticuerpos (Adams y cols, 2006). Ninguno de los sueros ensayados amplificó la infección por DEN 2 a la dilución 1/10 que se aproxima a las condiciones *in vivo*, todos los que amplificaron lo hicieron 1/100 y algunos de los que amplificaron 1/100 lo hicieron también 1/1000. De acuerdo a los títulos de anticuerpos detectados en los sueros inmunes a DEN 1 frente a las cepas de DEN 2, estos amplificaron de 1-2 Log por debajo del límite de detección por ELISA y a su vez en concentraciones subneutralizantes. Como 1/100 resultó la dilución óptima de los sueros inmunes a DEN 1 para la

amplificación de las cepas de DEN 2, esta se empleó para comparar la ADA entre los diferentes grupos (figura 13).

Los sueros de los animales inmunizados con PD10 mostraron una capacidad inmunoamplificadora baja únicamente frente a la cepa de genotipo asiático, a diferencia de los sueros de monos inoculados con el virus DEN 1 que mostraron el doble de la amplificación a esta misma dilución frente a ambos genotipos (figura 13). Aún cuando se obtuvieron niveles bajos de ADA a altas diluciones (1/100) de los sueros de los monos inmunizados con la proteína PD10, los niveles de amplificación resultaron similares a los observados para los sueros humanos homotípicos (DEN 2-H). En este caso, los sueros inmunes a DEN 2 representan la menor amplificación esperada, puesto que la infección por un serotipo del virus induce protección de larga duración frente al serotipo homólogo (Sabin, 1952). Por tanto, si los anticuerpos inducidos por PD10 muestran los mismos niveles de amplificación que los anticuerpos anti-DEN 2, estos no deben ser potencialmente sensibilizantes frente a una infección heterotípica por DEN 2.

La amplificación del virus DEN 2 por los sueros homotípicos a concentraciones subneutralizantes se demostró previamente en células K562 con anticuerpos monoclonales (Goncalvez y cols, 2007). La amplificación diferencial del genotipo asiático por los sueros humanos anti-DEN 2 puede estar dada por la capacidad de los anticuerpos de neutralizar a títulos mayores las cepas de genotipo americano (Kochel y cols, 2002; Kochel y cols, 2005; Guzman y cols, 2007).

El hecho de que el virus DEN 2 de genotipo asiático, y no el de genotipo americano, sea amplificado de manera diferencial por los sueros de monos inmunizados con PD10 pudiera estar directamente relacionado con las diferencias aminoacídicas existentes entre los dominios III de estos dos genotipos (Leitmeyer y cols, 1999). Previamente se demostró que la introducción de determinadas mutaciones en la secuencia aminoacídica de la proteína E del virus DEN 4 modula los niveles de ADA mediante la disminución de la afinidad de unión de los anticuerpos (Goncalvez y cols, 2007).

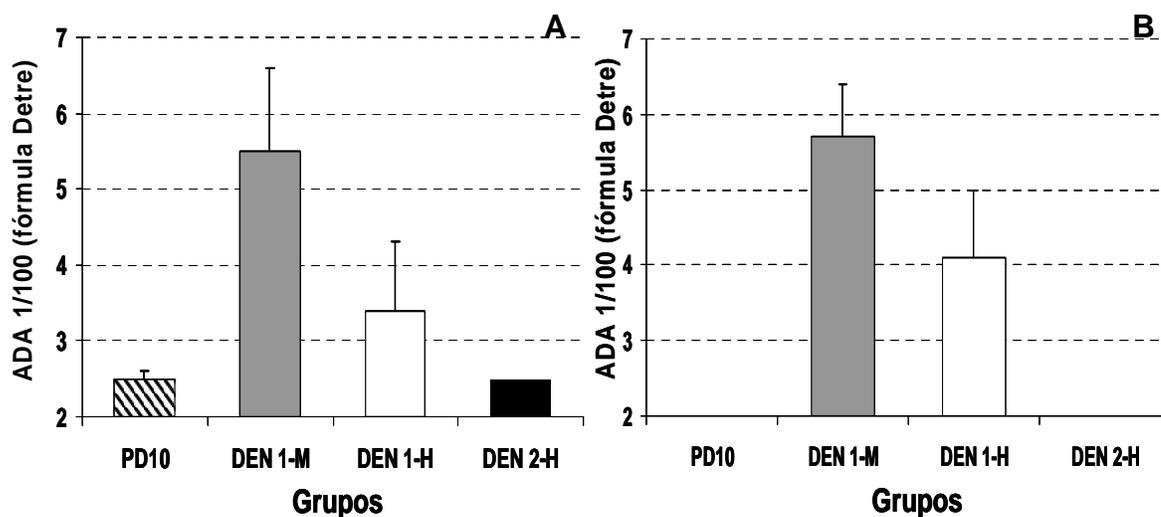


Figura 13. Capacidad amplificadora de la replicación viral de los sueros de los monos *M. fascicularis* inmunizados con PD10 o infectados con dengue 1 frente al serotipo 2. Los monos recibieron cuatro dosis de 0,1 mg de PD10 (PD10, n=2) o 10^6 ufp de DEN 1 Jamaica (DEN 1-M, n=2) y los sueros se colectaron 15 días tras la cuarta dosis y a los 60 días de la infección, respectivamente. Los sueros humanos se colectaron de individuos inmunes a DEN 1 a los 20 años de la infección (DEN 1-H, n=4) y a DEN 2 (DEN 2-H, n=4) en la fase convalescente. La ADA se realizó en células K562 con los sueros diluidos 1/100 frente a la cepa DEN 2 A15 (genotipo asiático) (A) y DEN 2 I348600 (genotipo americano) (B). El virus se tituló por formación de placas en células BHK-21 y la ADA se estimó por la fórmula: $(X_1 - X_0) / \sqrt{(X_1 + X_0)} \geq 1,96$ (X_1 : # de placas en la dilución de suero, X_0 : # de placas del control de virus). Los valores $\geq 1,96$ se consideran como positivos. Se representa el promedio de ADA \pm DS por grupo.

A diferencia de los sueros de los monos inmunizados con PD10 que no potenciaron la infección por DEN 2 cuando se ensayaron a diluciones bajas (1/10), los sueros de niños inmunizados con una vacuna tetravalente atenuada inmunoamplificaron a la dilución 1/12 que se aproxima a las condiciones *in vivo* (Guy y cols, 2004). Previamente se demostró que los anticuerpos inducidos tras la infección por el virus DEN están dirigidos principalmente contra el dominio II de la proteína de la envoltura (Lai y cols, 2008; Crill y cols, 2009). Los anticuerpos amplificadores se unen principalmente al dominio II de la proteína E y no al dominio III (Crill y Roehrig, 2001), lo que puede explicar las diferencias en la capacidad amplificadora de los anticuerpos inducidos por las proteínas

recombinantes basadas en el dominio III de la proteína E y por los virus vivos atenuados.

Por otra parte, resulta interesante discutir que los sueros de monos y humanos con infección primaria por DEN 1 mostraron niveles de amplificación viral elevados tanto para el genotipo asiático como para el americano. Como referimos anteriormente, las epidemias severas de FHD/SCD se asociaron a la infección secuencial DEN 1-DEN 2 de genotipo asiático y no de genotipo americano (Guzman y cols, 1991; Kochel y cols, 2002; Guzman y cols, 2007). Los resultados obtenidos sugieren que la diferencia en la severidad de la enfermedad por ambos genotipos durante las infecciones secundarias, no está sustentada por la capacidad de los anticuerpos anti-DEN 1 de amplificar uno u otro genotipo de DEN 2 en particular. Los estudios previos demostraron una capacidad replicativa mayor para las cepas del genotipo asiático en las células dendríticas y monocíticas humanas comparadas con las cepas de genotipo americano (Cologna y Rico-Hesse, 2003). A su vez, las cepas de DEN 2 de genotipo americano son neutralizadas *in vitro* por la inmunidad a DEN 1, a diferencia de las de genotipo asiático (Kochel y cols, 2002; Kochel y cols, 2005; Guzman y cols, 2007). Todos estos elementos unidos a nuestros resultados sugieren que las manifestaciones clínicas diferentes de estos dos genotipos del virus DEN 2 durante las infecciones secundarias, están asociadas a la capacidad de estos de replicarse en las células humanas y de ser o no neutralizados por la inmunidad heteróloga, y no a la habilidad de ser amplificados por los anticuerpos heterotípicos.

Los resultados obtenidos en este acápite apoyan las ventajas de las proteínas recombinantes que contienen al dominio III de la proteína E como formulaciones que pueden disminuir el riesgo de ADA durante las infecciones naturales que pueden seguir a la vacunación. Además, por primera vez se obtienen evidencias de que los anticuerpos inducidos tras la infección por el virus DEN 1 pueden amplificar la infección tanto de cepas del genotipo asiático como americano del serotipo 2.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Una vacunal ideal contra el DEN debe inducir protección contra los cuatro serotipos del virus, proveer inmunidad protectora de larga duración y, además, evitar la inducción de efectos adversos significativos después de la vacunación.

Los candidatos vacunales que se encuentran actualmente en fases más avanzadas de desarrollo están basados en la obtención de cepas atenuadas o de virus vivos recombinantes. La ventaja principal del empleo de virus vivos es la inducción de una respuesta inmune humoral y celular duradera, que simule a la infección natural por los virus del DEN. Hasta la actualidad dos vacunas tetravalentes atenuadas se evaluaron en estudios de fase clínica II, ambas obtenidas por pases seriados en células de riñón de perro beagle (Bhamarapavati y Sutee, 2000; Edelman y cols, 2003; Sabchareon y cols, 2004). También se evaluó ya en humano de forma monovalente un candidato atenuado obtenido de forma recombinante, obtenido a través de una delección de 30 nucleótidos en la región 3' no codificadora (Durbin y cols, 2005; Blaney y cols, 2006; Durbin y cols, 2006a). Sin embargo, estos candidatos provocaron los síntomas y signos de una infección por DEN después de la vacunación en humano e interferencia entre los cuatro componentes en el caso de las formulaciones tetravalentes, por lo que el desarrollo de vacunas vivas atenuadas enfrenta actualmente el reto de obtener un balance entre inmunogenicidad y reactogenicidad. El candidato recombinante que incluye los genes prM/E de los cuatro serotipos sobre el esqueleto atenuado de la cepa vacunal de FA, que es la estrategia viva recombinante más avanzada, también se evaluó en humano pero sólo de forma monovalente (Guirakhoo y cols, 2006).

Las vacunas recombinantes de subunidades tienen dos ventajas principales sobre las atenuadas que las hacen superiores desde el punto de vista regulatorio: 1) la seguridad debido a que no es posible la reversión al fenotipo virulento ni la inducción de los síntomas y signos propios de una infección por DEN, 2) pueden inducir una respuesta de anticuerpos balanceada debido a que los cuatro componentes de la formulación pueden ser equitativamente inmunogénicos. Ninguna de las vacunas recombinantes de subunidades en desarrollo se ha evaluado en humanos y de los estudios en monos, sólo el candidato que incluye al 80% de la proteína E del serotipo 2 indujo protección frente al reto viral (Putnak y cols, 2005). Las evidencias acumuladas en años recientes identificaron al dominio III de la proteína E como una región crítica para el desarrollo de subunidades vacunales. Este dominio constituye un blanco fundamental de anticuerpos neutralizantes (Crill y Roehrig, 2001), lo cual concuerda con su participación en la unión al receptor celular de las células diana (Kuhn y cols, 2002). La estrategia evaluada en este trabajo está enfocada precisamente en la fusión del dominio III de la proteína E de DEN 1 y DEN 2 a la proteína P64k de *N. meningitidis*, cuyas propiedades como proteína portadora y su seguridad se demostraron previamente en humanos (González y cols, 2000; Perez y cols, 2001).

Teniendo en cuenta que la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes P64k-dominio III de los serotipos 1 y 2 se demostró previamente en el modelo de ratón (Hermida y cols, 2004a; Hermida y cols, 2004b), y que la proteína de DEN 2 también se evaluó en monos *M. fascicularis* (Hermida y cols, 2006), en el presente trabajo nos propusimos como primer objetivo evaluar la proteína recombinante correspondiente al serotipo 1 en monos. En esta ocasión se consideró el uso comparativo de dos especies de monos, *M. fascicularis* y *M. mulatta*. Los resultados demostraron que la proteína recombinante que contiene al dominio III de la proteína E del virus DEN 1 fusionado a la proteína P64k de *N. meningitidis* es inmunogénica y protectora en monos, lo que constituye el primer estudio en este modelo animal de proteínas recombinantes del virus DEN 1.

Los datos obtenidos respecto a la inmunogenicidad y a la capacidad protectora de la inmunidad inducida por la proteína de DEN 1 resultaron similares en monos *M.*

mulatta y *M. fascicularis*, lo que valida el uso de estos últimos para la evaluación de las proteínas recombinantes dominio III-P64k, en comparación con los monos *M. mulatta* que son considerados como el mejor modelo para los estudios de infección por el virus DEN. Aún cuando los monos *M. fascicularis* se emplearon con anterioridad para la evaluación de inmunógenos contra el virus DEN (Velzing y cols, 1999; Guzman y cols, 2003b; Koraka y cols, 2007a; Koraka y cols, 2007b), estos no se habían comparado con los *M. mulatta*. La comparación de ambas especies de monos también valida el estudio previo realizado en monos *M. fascicularis* con la proteína recombinante del serotipo 2.

Una vez completados los estudios de la inmunogenicidad y de la capacidad protectora de las proteínas recombinantes de los serotipos 1 y 2 en monos, se caracterizó la respuesta inmune humoral inducida por ellas en este modelo. Primeramente se estudió la respuesta de anticuerpos desarrollada después del reto viral en los animales inmunizados con estas proteínas recombinantes. Los resultados mostraron que las proteínas PD10 y PD5 sensibilizan eficientemente al sistema inmune ante la infección por los virus DEN 1 o DEN 2, respectivamente. Además, se demostró que la proteína PD5 sensibiliza al sistema inmune ante la infección con el virus DEN 2 tan eficientemente como una dosis del propio virus. Estas evidencias apoyan el uso de estas proteínas recombinantes, además de por sí solas, en estrategias de inmunización combinadas con cepas atenuadas. La combinación de las proteínas recombinantes P64k-dominio III con cepas atenuadas podría revertir las principales desventajas de ambos enfoques. Si bien se demostró que las proteínas recombinantes de DEN 1 y DEN 2 inducen una respuesta inmune protectora en monos, la duración de esta respuesta en el tiempo así como la inducción de una respuesta inmune celular son aún atenuantes de este tipo de estrategia. La utilización de estrategias de inmunización que combinen vacunas de subunidades recombinantes con vacunas atenuadas puede incrementar la duración de la respuesta inmune en el tiempo, favorecer la inducción de una respuesta celular y a la vez evitar el desarrollo de las reacciones adversas severas, que constituyen una de las principales desventajas de los candidatos basados en cepas atenuadas.

También evaluamos la reactividad cruzada de los anticuerpos inducidos por las proteínas recombinantes PD10 y PD5 en monos *M. fascicularis*, enfocada inicialmente a la capacidad de estos anticuerpos de neutralizar cepas de diferentes genotipos de cada serotipo. Teniendo en cuenta que los anticuerpos neutralizantes son considerados el principal marcador de inmunidad protectora para los virus del DEN (Hombach y cols, 2007), la inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes amplia debe ser uno de los objetivos principales de los candidatos vacunales. Los resultados obtenidos demostraron que los anticuerpos neutralizantes inducidos por las proteínas recombinantes PD10 y PD5 están dirigidos contra cepas de diferentes genotipos, lo que avala su empleo como formulación vacunal en regiones con circulación de diferentes variantes virales.

El empleo de enfoques basados en el dominio III de la proteína E para el desarrollo de vacunas tiene como una de sus ventajas la inducción de una respuesta de anticuerpos específica al serotipo homólogo, y por tanto, la disminución del riesgo de la ADA durante las infecciones naturales siguientes a la vacunación. Sin embargo, los estudios previos de la especificidad de serotipo de la respuesta de anticuerpos inducida por proteínas recombinantes que contienen al dominio III de la proteína E se realizaron en ratones (Simmons y cols, 1998; Simmons y cols, 2001a; Khanam y cols, 2006a; Khanam y cols, 2007). Con estas consideraciones se evaluó la reactividad cruzada de los anticuerpos inducidos por PD10 y PD5 a los cuatro serotipos del virus DEN en el modelo de mono. Los resultados obtenidos demostraron que las proteínas recombinantes PD10 y PD5 inducen una respuesta de anticuerpos mayoritaria contra los serotipos 1 y 2, respectivamente. No obstante, los niveles de anticuerpos de reactividad cruzada inducidos por las proteínas recombinantes en monos fueron superiores a los detectados anteriormente en el modelo de ratón, por lo que su implicación en la ADA debe ser estudiada.

Debido a que las infecciones primarias por el serotipo 1, y no por el serotipo 2, seguidas de infecciones secundarias por el virus DEN 2 constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de epidemias de FHD (Guzman y cols, 1991; Alvarez y cols, 2006), se evaluó particularmente la capacidad amplificadora de los

anticuerpos inducidos por la proteína recombinante del serotipo 1 frente al virus DEN 2. Los anticuerpos generados contra la proteína recombinante del serotipo 1 mostraron niveles bajos de amplificación frente al virus DEN 2 y sólo a altas diluciones de suero, a diferencia de la capacidad amplificadora referida para sueros de niños vacunados con formulaciones tetravalentes atenuadas de DEN, que muestran amplificación a diluciones de suero que simulan las condiciones *in vivo* (Guy y cols, 2004). Los niveles de amplificación obtenidos para los sueros de monos vacunados con PD10 fueron similares a los observados para sueros humanos homotípicos, que representan la menor amplificación esperada.

Los resultados obtenidos en este trabajo avalan las potencialidades de las proteínas recombinantes de fusión P64k-dominio III de DEN 1 y DEN 2 como futuros candidatos vacunales. La proteína recombinante del serotipo 1 induce una respuesta inmune protectora en monos y disminuye el riesgo de la ADA frente al virus DEN 2. Las proteínas recombinantes de DEN 1 y DEN 2 sensibilizan al sistema inmune ante la infección por el virus DEN, e inducen una respuesta de anticuerpos mayoritaria contra el serotipo homólogo y a la vez neutralizante a varios genotipos del serotipo homólogo.

6. CONCLUSIONES

1. La proteína recombinante que contiene al dominio III del virus DEN 1 fusionado a la proteína P64k de *Neisseria meningitidis* es potencialmente inmunogénica y protectora en monos *M. fascicularis* y *M. mulatta* frente al reto viral homólogo.
2. Las proteínas PD10 y PD5 generan una respuesta de memoria de anticuerpos antivirales que se activa tras el reto con el serotipo homólogo.
3. Los anticuerpos que se generan tras la administración de las proteínas recombinantes PD10 y PD5 en monos neutralizan a varias cepas del serotipo homólogo.
4. La respuesta inmune humoral generada por las proteínas PD10 y PD5 en monos se dirige mayoritariamente al serotipo homólogo.
5. Los anticuerpos generados por la inmunización en monos con la proteína PD10 reducen la ADA frente al virus DEN 2 *in vitro* que se detecta tras la inoculación con el virus DEN 1.

7. RECOMENDACIONES

1. Evaluar las proteínas recombinantes con otros adyuvantes o proteínas inmunomoduladoras de posible uso en humanos.
2. Ampliar la evaluación de la capacidad amplificadora de los anticuerpos inducidos al resto de los serotipos.
3. Medir la respuesta celular y el perfil de citoquinas tras la inmunización con las proteínas recombinantes en monos.
4. Desarrollar esquemas de inmunización que combinen las proteínas recombinantes PD10 y PD5 con cepas atenuadas de la competencia.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams, B., Holmes, E. C., Zhang, C., Mammen, M. P., Jr., Nimmannitya, S., Kalayanaroj, S. y Boots, M. (2006). Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(38): 14234-14239.
- Agarwal, R., Elbishbishi, E. A., Chaturvedi, U. C., Nagar, R. y Mustafa, A. S. (1999). Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. *Int J Exp Pathol* 80(3): 143-149.
- Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C. y Heinz, F. X. (1995). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *J Virol* 69(2): 695-700.
- Alvarez, M., Rodriguez-Roche, R., Bernardo, L., Morier, L. y Guzman, G. (2005). Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of Some Factors. *Dengue Bulletin* 29: 1-9.
- Alvarez, M., Rodriguez-Roche, R., Bernardo, L., Vazquez, S., Morier, L., Gonzalez, D., Castro, O., Kouri, G., Halstead, S. B. y Guzman, M. G. (2006). Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg* 75(6): 1113-1117.
- Alvarez, M., Pavon-Oro, A., Rodriguez-Roche, R., Bernardo, L., Morier, L., Sanchez, L., Alvarez, A. M. y Guzman, M. G. (2008). Neutralizing antibody response variation against dengue 3 strains. *J Med Virol* 80(10): 1783-1789.
- Apt, D., Raviprakash, K., Brinkman, A., Semyonov, A., Yang, S., Skinner, C., Diehl, L., Lyons, R., Porter, K. y Punnonen, J. (2005). Tetravalent neutralizing antibody response against four dengue serotypes by a single chimeric dengue envelope antigen. *Vaccine* 24(3): 335-344.
- Basu, A. y Chaturvedi, U. C. (2008). Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53(3): 287-299.
- Beaumier, C. M., Mathew, A., Bashyam, H. S. y Rothman, A. L. (2008). Cross-reactive memory CD8(+) T cells alter the immune response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. *J Infect Dis* 197(4): 608-617.
- Beaumier, C. M. y Rothman, A. L. (2009). Cross-reactive memory CD4+ T cells alter the CD8+ T-cell response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. *Viral Immunol* 22(3): 215-219.
- Bhamarapravati, N. y Sutee, Y. (2000). Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 18(2): 44-47.
- Blair, P. J., Kochel, T. J., Raviprakash, K., Guevara, C., Salazar, M., Wu, S. J., Olson, J. G. y Porter, K. R. (2006). Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in *Aotus nancymae* monkeys. *Vaccine* 24(9): 1427-1432.

- Blaney, J. E., Jr., Hanson, C. T., Firestone, C. Y., Hanley, K. A., Murphy, B. R. y Whitehead, S. S. (2004a). Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg* 71(6): 811-821.
- Blaney, J. E., Jr., Hanson, C. T., Hanley, K. A., Murphy, B. R. y Whitehead, S. S. (2004b). Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2. *BMC Infect Dis* 4(Oct 4): 39.
- Blaney, J. E., Jr., Matro, J. M., Murphy, B. R. y Whitehead, S. S. (2005). Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in *rhesus* monkeys. *J Virol* 79(9): 5516-5528.
- Blaney, J. E., Jr., Durbin, A. P., Murphy, B. R. y Whitehead, S. S. (2006). Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics. *Viral Immunol* 19(1): 10-32.
- Blaney, J. E., Jr., Sathe, N. S., Hanson, C. T., Firestone, C. Y., Murphy, B. R. y Whitehead, S. S. (2007). Vaccine candidates for dengue virus type 1 (DEN1) generated by replacement of the structural genes of rDEN4 and rDEN4Delta30 with those of DEN1. *Viol J* 4(Feb 28): 23.
- Blaney, J. E., Jr., Sathe, N. S., Goddard, L., Hanson, C. T., Romero, T. A., Hanley, K. A., Murphy, B. R. y Whitehead, S. S. (2008). Dengue virus type 3 vaccine candidates generated by introduction of deletions in the 3' untranslated region (3'-UTR) or by exchange of the DENV-3 3'-UTR with that of DENV-4. *Vaccine* 26(6): 817-828.
- Boonnak, K., Slike, B. M., Burgess, T. H., Mason, R. M., Wu, S. J., Sun, P., Porter, K., Rudiman, I. F., Yuwono, D., Puthavathana, P. y Marovich, M. A. (2008). Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol* 82(8): 3939-3951.
- Brandler, S., Lucas-Hourani, M., Moris, A., Frenkiel, M. P., Combredet, C., Fevrier, M., Bedouelle, H., Schwartz, O., Despres, P. y Tangy, F. (2007). Pediatric Measles Vaccine Expressing a Dengue Antigen Induces Durable Serotype-specific Neutralizing Antibodies to Dengue Virus. *PLoS Negl Trop Dis* 1(3): e96.
- Bray, M., Men, R. y Lai, C. J. (1996). Monkeys immunized with intertypic chimeric dengue viruses are protected against wild-type virus challenge. *J Virol* 70(6): 4162-4166.
- Burke, D. S. y Monath, T. P. (2001). Flaviviruses. *Fields Virology*. Knippe, D. M. y Howley, P. M. London-New York-Tokyo, Lippincott Williams & Wilkins. 1: 1043-1125.
- Butrapet, S., Huang, C. Y., Pierro, D. J., Bhamarapavati, N., Gubler, D. J. y Kinney, R. M. (2000). Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. *J Virol* 74(7): 3011-3019.
- Cantelar de Francisco, N., Fernandez, A., Albert Molina, L. y Perez Balbis, E. (1981). [Survey of dengue in Cuba. 1978-1979]. *Rev Cubana Med Trop* 33(1): 72-78.
- Carlos, C. C., Oishi, K., Cinco, M. T., Mapua, C. A., Inoue, S., Cruz, D. J., Pancho, M. A., Tanig, C. Z., Matias, R. R., Morita, K., Natividad, F. F., Igarashi, A. y Nagatake, T. (2005). Comparison of clinical features and hematologic abnormalities between

- dengue fever and dengue hemorrhagic fever among children in the Philippines. *Am J Trop Med Hyg* 73(2): 435-440.
- Chakravarti, A. y Kumaria, R. (2006). Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. *Indian J Med Res* 123(1): 25-30.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R. y Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol* 44: 649-688.
- Chambers, T. J., Jiang, X., Droll, D. A., Liang, Y., Wold, W. S. y Nickells, J. (2006). Chimeric Japanese encephalitis virus/dengue 2 virus infectious clone: biological properties, immunogenicity and protection against dengue encephalitis in mice. *J Gen Virol* 87(Pt 11): 3131-3140.
- Chareonsirisuthigul, T., Kalayanarooj, S. y Ubol, S. (2007). 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 THP-1 cells. *J Gen Virol* 88(Pt 2): 365-375.
- Chaturvedi, U., Nagar, R. y Shrivastava, R. (2006a). Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47(2): 155-166.
- Chaturvedi, U. C., Elbishbishi, E. A., Agarwal, R., Raghupathy, R., Nagar, R., Tandon, R., Pacsa, A. S., Younis, O. I. y Azizieh, F. (1999). Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *J Med Virol* 59(3): 335-340.
- Chaturvedi, U. C. (2006). Tumour necrosis factor & dengue. *Indian J Med Res* 123(1): 11-14.
- Chaturvedi, U. C., Nagar, R. y Shrivastava, R. (2006b). Macrophage and dengue virus: friend or foe? *Indian J Med Res* 124(1): 23-40.
- Chaturvedi, U. C., Shrivastava, R., Tripathi, R. K. y Nagar, R. (2007). Dengue virus-specific suppressor T cells: current perspectives. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50(3): 285-299.
- Chen, H. C., Hofman, F. M., Kung, J. T., Lin, Y. D. y Wu-Hsieh, B. A. (2007a). Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol* 81(11): 5518-5526.
- Chen, J. P., Lu, H. L., Lai, S. L., Campanella, G. S., Sung, J. M., Lu, M. Y., Wu-Hsieh, B. A., Lin, Y. L., Lane, T. E., Luster, A. D. y Liao, F. (2006a). Dengue virus induces expression of CXC chemokine ligand 10/IFN-gamma-inducible protein 10, which competitively inhibits viral binding to cell surface heparan sulfate. *J Immunol* 177(5): 3185-3192.
- Chen, L., Ewing, D., Subramanian, H., Block, K., Rayner, J., Alterson, K. D., Sedegah, M., Hayes, C., Porter, K. y Raviprakash, K. (2007b). A heterologous DNA prime-Venezuelan equine encephalitis virus replicon particle boost dengue vaccine regimen affords complete protection from virus challenge in *cynomolgus macaques*. *J Virol* 81(21): 11634-11639.

- Chen, L. C., Lei, H. Y., Liu, C. C., Shiesh, S. C., Chen, S. H., Liu, H. S., Lin, Y. S., Wang, S. T., Shyu, H. W. y Yeh, T. M. (2006b). Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* 74(1): 142-147.
- Chen, S., Yu, M., Jiang, T., Deng, Y., Qin, C. y Qin, E. (2007c). Induction of tetravalent protective immunity against four dengue serotypes by the tandem domain III of the envelope protein. *DNA Cell Biol* 26(6): 361-367.
- Clarke, D. H. y Casals, J. (1958). Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 7(5): 561-573.
- Clyde, K. y Harris, E. (2006). RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol* 80(5): 2170-2182.
- Clyde, K., Kyle, J. L. y Harris, E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol* 80(23): 11418-11431.
- Cologna, R. y Rico-Hesse, R. (2003). American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* 77(7): 3929-3938.
- Costa, S. M., Freire, M. S. y Alves, A. M. (2006a). DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine* 24(21): 4562-4564.
- Costa, S. M., Paes, M. V., Barreto, D. F., Pinhao, A. T., Barth, O. M., Queiroz, J. L., Armoa, G. R., Freire, M. S. y Alves, A. M. (2006b). Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine* 24(2): 195-205.
- Costa, S. M., Azevedo, A. S., Paes, M. V., Sarges, F. S., Freire, M. S. y Alves, A. M. (2007). DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology* 358(2): 413-423.
- Crill, W. D. y Roehrig, J. T. (2001). 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* 75(16): 7769-7773.
- Crill, W. D., Hughes, H. R., Delorey, M. J. y G.J., C. (2009). Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. *PLoS One* 4(4): e4991.
- De Paula, S. O. y Lopes da Fonseca, B. A. (2002). Optimizing dengue diagnosis by RT-PCR in IgM-positive samples: comparison of whole blood, buffy-coat and serum as clinical samples. *J Virol Methods* 102(1-2): 113-117.
- Detre, K. y White, C. (1970). The comparison of two Poisson distributed observations. *Biometrics* 26: 851-854.
- Diaz, A., Kouri, G., Guzman, M. G., Lobaina, L., Bravo, J., Ruiz, A., Ramos, A. y Martinez, R. (1988). Description of the clinical picture of dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) in adults. *Bull Pan Am Health Organ* 22(2): 133-144.

- Dong, T., Moran, E., Vinh Chau, N., Simmons, C., Luhn, K., Peng, Y., Wills, B., Phuong Dung, N., Thi Thu Thao, L., Hien, T. T., McMichael, A., Farrar, J. y Rowland-Jones, S. (2007). High Pro-Inflammatory Cytokine Secretion and Loss of High Avidity Cross-Reactive Cytotoxic T-Cells during the Course of Secondary Dengue Virus Infection. *PLoS ONE* 2(12): e1192.
- Durbin, A. P., Karron, R. A., Sun, W., Vaughn, D. W., Reynolds, M. J., Perreault, J. R., Thumar, B., Men, R., Lai, C. J., Elkins, W. R., Chanock, R. M., Murphy, B. R. y Whitehead, S. S. (2001). Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. *Am J Trop Med Hyg* 65(5): 405-413.
- Durbin, A. P., Whitehead, S. S., McArthur, J., Perreault, J. R., Blaney, J. E., Jr., Thumar, B., Murphy, B. R. y Karron, R. A. (2005). rDEN4delta30, a live attenuated dengue virus type 4 vaccine candidate, is safe, immunogenic, and highly infectious in healthy adult volunteers. *J Infect Dis* 191(5): 710-718.
- Durbin, A. P., McArthur, J., Marron, J. A., Blaney, J. E., Jr., Thumar, B., Wanionek, K., Murphy, B. R. y Whitehead, S. S. (2006a). The live attenuated dengue serotype 1 vaccine rDEN1Delta30 is safe and highly immunogenic in healthy adult volunteers. *Hum Vaccin* 2(4): 167-173.
- Durbin, A. P., McArthur, J. H., Marron, J. A., Blaney, J. E., Thumar, B., Wanionek, K., Murphy, B. R. y Whitehead, S. S. (2006b). rDEN2/4Delta30(ME), a live attenuated chimeric dengue serotype 2 vaccine is safe and highly immunogenic in healthy dengue-naive adults. *Hum Vaccin* 2(6): 255-260.
- Eckels, K. H., Dubois, D. R., Putnak, R., Vaughn, D. W., Innis, B. L., Henchal, E. A. y Hoke, C. H., Jr. (2003). Modification of dengue virus strains by passage in primary dog kidney cells: preparation of candidate vaccines and immunization of monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 69(6 Suppl): 12-16.
- Edelman, R., Wasserman, S. S., Bodison, S. A., Putnak, R. J., Eckels, K. H., Tang, D., Kanesa-Thanan, N., Vaughn, D. W., Innis, B. L. y Sun, W. (2003). Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 69(6 Suppl): 48-60.
- Endy, T. P., Chunsuttiwat, S., Nisalak, A., Libraty, D. H., Green, S., Rothman, A. L., Vaughn, D. W. y Ennis, F. A. (2002). Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol* 156(1): 40-51.
- Endy, T. P., Nisalak, A., Chunsuttitwat, S., Vaughn, D. W., Green, S., Ennis, F. A., Rothman, A. L. y Libraty, D. H. (2004). Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis* 189(6): 990-1000.
- Etemad, B., Batra, G., Raut, R., Dahiya, S., Khanam, S., Swaminathan, S. y Khanna, N. (2008). 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* 79(3): 353-363.

- Falconar, A. K. (2008). Monoclonal antibodies that bind to common epitopes on the dengue virus type 2 nonstructural-1 and envelope glycoproteins display weak neutralizing activity and differentiated responses to virulent strains: implications for pathogenesis and vaccines. *Clin Vaccine Immunol* 15(3): 549-561.
- Falgout, B., Bray, M., Schlesinger, J. J. y Lai, C. J. (1990). Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J Virol* 64(9): 4356-4363.
- Fleitas, O. (2007). Reactividad cruzada asociada a las proteínas recombinantes que contienen al dominio III de la proteína de la envoltura de los virus dengue 1 y 2. Tesis de diploma. Departamento de Virología, IPK. Ciudad de la Habana, Facultad de Biología, Universidad de la Habana.
- Fonseca, B. A. L., Khoshnood, K., Shope, R. E. y Mason, P. W. (1991). Flavivirus type-specific antigens produced from fusions of a portion of the E protein gene with the *Escherichia coli* TRPE gene. *Am J Trop Med Hyg* 44(5): 500-508.
- Freire, M., Marchevsky, R., Almeida, L., Yamamura, A., Caride, E., Brindeiro, P., Motta, M., Nogueira, R., Kubelka, C., Bonaldo, M. y Galler, R. (2007). Wild dengue virus types 1, 2 and 3 viremia in *rhesus* monkeys. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(2): 203-208.
- Gagnon, S. J., Mori, M., Kurane, I., Green, S., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., Ennis, F. A. y Rothman, A. L. (2002). Cytokine gene expression and protein production in peripheral blood mononuclear cells of children with acute dengue virus infections. *J Med Virol* 67(1): 41-46.
- Gao, G., Wang, Q., Dai, Z., Calcedo, R., Sun, X., Li, G. y Wilson, J. M. (2008). Adenovirus-based vaccines generate cytotoxic T lymphocytes to epitopes of NS1 from dengue virus that are present in all major serotypes. *Hum Gene Ther* 19(9): 927-936.
- Gil, L., López, C., Blanco, A., Lazo, L., Martín, J., Valdés, I., Romero, Y., Figueroa, Y., Guillén, G. y Hermida, L. (2009). The cellular immune response plays an important role in protecting against dengue virus in the mouse encephalitis model. *Viral Immunol* 22(1): 23-30.
- Goncalvez, A. P., Engle, R. E., St Claire, M., Purcell, R. H. y Lai, C. J. (2007). Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection *in vitro* and *in vivo* and strategies for prevention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22): 9422-9427.
- Gonzalez, D., Castro, O. E., Kouri, G., Perez, J., Martinez, E., Vazquez, S., Rosario, D., Cancio, R. y Guzman, M. G. (2005). Classical dengue hemorrhagic fever resulting from two dengue infections spaced 20 years or more apart: Havana, Dengue 3 epidemic, 2001-2002. *Int J Infect Dis* 9(5): 280-285.
- González, S., Álvarez, A. y Caballero, E. (2000). P64k meningococcal protein as immunological carrier for weak immunogens. *Scand J Immunol* 52(2): 113-116.
- Green, S., Vaughn, D. W., Kalayanarooj, S., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Nisalak, A., Rothman, A. L. y Ennis, F. A. (1999). Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol* 59(3): 329-334.

- Gromowski, G. D. y Barrett, A. D. (2007). Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. *Virology* 366(2): 349-360.
- Gubler, D. J. y Clark, G. G. (1994). Community-based integrated control of *Aedes aegypti*: a brief overview of current programs. *Am J Trop Med Hyg* 50(6 Suppl): 50-60.
- Guillen, G., Alvarez, A., Silva, R., Morera, V., Gonzalez, S., Musacchio, A., Besada, V., Coizeau, E., Caballero, E., Nazabal, C., Carmenate, T., Gonzalez, L. J., Estrada, R., Tambara, Y., Padron, G. y Herrera, L. (1998). Expression in *Escherichia coli* of the IpdA gene, protein sequence analysis and immunological characterization of the P64k protein from *Neisseria meningitidis*. *Biotechnol Appl Biochem* 27 (Pt 3): 189-196.
- Guirakhoo, F., Weltzin, R., Chambers, T. J., Zhang, Z. X., Soike, K., Ratterree, M., Arroyo, J., Georgakopoulos, K., Catalan, J. y Monath, T. P. (2000). Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J Virol* 74(12): 5477-5485.
- Guirakhoo, F., Arroyo, J., Pugachev, K. V., Miller, C., Zhang, Z. X., Weltzin, R., Georgakopoulos, K., Catalan, J., Ocran, S., Soike, K., Ratterree, M. y Monath, T. P. (2001). Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol* 75(16): 7290-7304.
- Guirakhoo, F., Pugachev, K., Arroyo, J., Miller, C., Zhang, Z. X., Weltzin, R., Georgakopoulos, K., Catalan, J., Ocran, S., Draper, K. y Monath, T. P. (2002). 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* 298(1): 146-159.
- Guirakhoo, F., Pugachev, K., Zhang, Z., Myers, G., Levenbook, I., Draper, K., Lang, J., Ocran, S., Mitchell, F., Parsons, M., Brown, N., Brandler, S., Fournier, C., Barrere, B., Rizvi, F., Travassos, A., Nichols, R., Trent, D. y Monath, T. (2004a). Safety and efficacy of chimeric yellow Fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. *J Virol* 78(9): 4761-4775.
- Guirakhoo, F., Zhang, Z., Myers, G., Johnson, B. W., Pugachev, K., Nichols, R., Brown, N., Levenbook, I., Draper, K., Cyrek, S., Lang, J., Fournier, C., Barrere, B., Delagrave, S. y Monath, T. P. (2004b). A single amino acid substitution in the envelope protein of chimeric yellow fever-dengue 1 vaccine virus reduces neurovirulence for suckling mice and viremia/viscerotropism for monkeys. *J Virol* 78(18): 9998-10008.
- Guirakhoo, F., Kitchener, S., Morrison, D., Forrat, R., McCarthy, K., Nichols, R., Yoksan, S., Duan, X., Ermak, T. H., Kanesa-Thasan, N., Bedford, P., Lang, J., Quentin-Millet, M. J. y Monath, T. P. (2006). Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVax-DEN2) vaccine: Phase I clinical trial for safety and immunogenicity: effect of yellow fever pre-immunity in induction of cross neutralizing antibody responses to all 4 dengue serotypes. *Hum Vaccin* 2(2): 60-67.

- Guy, B., Chanthavanich, P., Gimenez, S., Sirivichayakul, C., Sabchareon, A., Begue, S., Yoksan, S., Luxemburger, C. y Lang, J. (2004). Evaluation by flow cytometry of antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue infection by sera from Thai children immunized with a live-attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 22(27-28): 3563-3574.
- Guy, B. y Almond, J. W. (2008). Towards a dengue vaccine: Progress to date and remaining challenges. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31(2-3): 239-252.
- Guy, B., Nougarede, N., Begue, S., Sanchez, V., Souag, N., Carre, M., Chambonneau, L., Morrisson, D. N., Shaw, D., Qiao, M., Dumas, R., Lang, J. y Forrat, R. (2008). Cell-mediated immunity induced by chimeric tetravalent dengue vaccine in naive or flavivirus-primed subjects. *Vaccine* 26(45): 5712-5721.
- Guy, B., Barban, V., Mantel, N., Aguirre, M., Gulia, S., Pontvianne, J., Jourdir, T. M., Ramirez, L., Gregoire, V., Charnay, C., Burdin, N., Dumas, R. y Lang, J. (2009). Evaluation of interferences between dengue vaccine serotypes in a monkey model. *Am J Trop Med Hyg* 80(2): 302-311.
- Guzman, M. G., Kouri, G. P., Bravo, J., Soler, M., Vazquez, S. y Morier, L. (1990). Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 42(2): 179-184.
- Guzman, M. G., Kouri, G., Bravo, J., Soler, M. y Martinez, E. (1991). Sequential infection as risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) during the 1981 dengue hemorrhagic Cuban epidemic. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86(3): 367.
- Guzman, M. G., Alvarez, M., Rodriguez, R., Rosario, D., Vazquez, S., Valdes, L., Cabrera, M. V. y Kouri, G. (1999). Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis* 3(3): 130-135.
- Guzman, M. G., Kouri, G. y Halstead, S. B. (2000a). Do escape mutants explain rapid increases in dengue case-fatality rates within epidemics? *Lancet* 355(9218): 1902-1903.
- Guzman, M. G., Kouri, G., Valdes, L., Bravo, J., Alvarez, M., Vazquez, S., Delgado, I. y Halstead, S. B. (2000b). Epidemiologic studies on Dengue in Santiago de Cuba, 1997. *Am J Epidemiol* 152(9): 793-799.
- Guzman, M. G., Kouri, G., Valdes, L., Bravo, J., Vazquez, S. y Halstead, S. B. (2002). Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica* 11(4): 223-227.
- Guzman, M. G. y Kouri, G. (2003). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* 27(1): 1-13.
- Guzman, M. G., Pelegrino, J. L., Pumariega, T., Vazquez, S., Gonzalez, L., Kouri, G. y Arias, J. (2003a). [Quality control of the serological diagnosis of dengue in laboratories throughout the Americas, 1996-2001]. *Rev Panam Salud Publica* 14(6): 371-376.
- Guzman, M. G., Rodriguez, R., Hermida, L., Alvarez, M., Lazo, L., Mune, M., Rosario, D., Valdes, K., Vazquez, S., Martinez, R., Serrano, T., Paez, J., Espinosa, R.,

- Pumariega, T. y Guillen, G. (2003b). 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* 69(2): 129-134.
- Guzman, M. G., Alvarez, M., Rodriguez-Roche, R., Bernardo, L., Montes, T., Vazquez, S., Morier, L., Alvarez, A., Gould, E. A., Kouri, G. y Halstead, S. B. (2007). Neutralizing antibodies after infection with dengue 1 virus. *Emerg Infect Dis* 13(2): 282-286.
- Halstead, S. B., Scanlon, J. E., Umpaivit, P. y Udomsakdi, S. (1969). Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. *Am J Trop Med Hyg* 18(6): 997-1021.
- Halstead, S. B., Nimmannitya, S. y Cohen, S. N. (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* 42(5): 311-328.
- Halstead, S. B. y Simasthien, P. (1970). Observations related to the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. II. Antigenic and biologic properties of dengue viruses and their association with disease response in the host. *Yale J Biol Med* 42(5): 276-292.
- Halstead, S. B., Casals, J., Shotwell, H. y Palumbo, N. (1973). Studies on the immunization of monkeys against dengue. I. Protection derived from single and sequential virus infections. *Am J Trop Med Hyg* 22(3): 365-374.
- Halstead, S. B. y Palumbo, N. E. (1973). Studies on the immunization of monkeys against dengue. II. Protection following inoculation of combinations of viruses. *Am J Trop Med Hyg* 22(3): 375-381.
- Halstead, S. B. (1974). Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg* 23(5): 974-982.
- Halstead, S. B., Venkateshan, C. N., Gentry, M. K. y Larsen, L. K. (1984). Heterogeneity of infection enhancement of dengue 2 strains by monoclonal antibodies. *J Immunol* 132(3): 1529-1532.
- Halstead, S. B. y Marchette, N. J. (2003). Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *Am J Trop Med Hyg* 69(6 Suppl): 5-11.
- Harris, E., Videa, E., Perez, L., Sandoval, E., Tellez, Y., Perez, M. L., Cuadra, R., Rocha, J., Idiaquez, W., Alonso, R. E., Delgado, M. A., Campo, L. A., Acevedo, F., Gonzalez, A., Amador, J. J. y Balmaseda, A. (2000). Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 63(1-2): 5-11.
- Heinz, F. X., Stiasny, K., Puschner Auer, G., Holzmann, H., Allison, S. L., Mandl, C. W. y Kunz, C. (1994). Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* 198(1): 109-117.

- Henchal, E. A., Gentry, M. K., McCown, J. M. y Brandt, W. E. (1982). Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 31(4): 830-836.
- Henchal, E. A., McCown, J. M., Seguin, M. C., Gentry, M. K. y Brandt, W. E. (1983). Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg* 32(1): 164-169.
- Hermida, L., Rodriguez, R., Lazo, L., Bernardo, L., Silva, R., Zulueta, A., Lopez, C., Martin, J., Valdes, I., del Rosario, D., Guillen, G. y Guzman, M. G. (2004a). A fragment of the envelope protein from dengue-1 virus, fused in two different sites of the meningococcal P64k protein carrier, induces a functional immune response in mice. *Biotechnol Appl Biochem* 39(Pt 1): 107-114.
- Hermida, L., Rodriguez, R., Lazo, L., Silva, R., Zulueta, A., Chinae, G., Lopez, C., Guzman, M. G. y Guillen, G. (2004b). 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* 115(1): 41-49.
- Hermida, L., Bernardo, L., Martin, J., Alvarez, M., Prado, I., Lopez, C., Sierra Bde, L., Martinez, R., Rodriguez, R., Zulueta, A., Perez, A. B., Lazo, L., Rosario, D., Guillen, G. y Guzman, M. G. (2006). A recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue-2 envelope protein is immunogenic and protective in nonhuman primates. *Vaccine* 24(16): 3165-3171.
- Hilgard, P. y Stockert, R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32(5): 1069-1077.
- Hiramatsu, K., Tadano, M., Men, R. y Lai, C. J. (1996). Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence. *Virology* 224(2): 437-445.
- Hober, D., Delannoy, A. S., Benyoucef, S., De Groote, D. y Wattre, P. (1996). High levels of sTNFR p75 and TNF alpha in dengue-infected patients. *Microbiol Immunol* 40(8): 569-573.
- Holman, D. H., Wang, D., Raviprakash, K., Raja, N. U., Luo, M., Zhang, J., Porter, K. R. y Dong, J. Y. (2007). Two complex, adenovirus-based vaccines that together induce immune responses to all four dengue virus serotypes. *Clin Vaccine Immunol* 14(2): 182-189.
- Hombach, J. (2007). Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. *Rev Panam Salud Publica* 21(4): 254-260.
- Hombach, J., Cardoso, M. J., Sabchareon, A., Vaughn, D. W. y Barrett, A. D. (2007). Scientific consultation on immunological correlates of protection induced by dengue vaccines report from a meeting held at the World Health Organization 17-18 November 2005. *Vaccine* 25(21): 4130-4139.
- Huang, C. Y., Butrapet, S., Tsuchiya, K. R., Bhamarapravati, N., Gubler, D. J. y Kinney, R. M. (2003). Dengue 2 PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. *J Virol* 77(21): 11436-11447.

- Huang, K. J., Yang, Y. C., Lin, Y. S., Huang, J. H., Liu, H. S., Yeh, T. M., Chen, S. H., Liu, C. C. y Lei, H. Y. (2006). The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol* 176(5): 2825-2832.
- Huber, A. R., Kunkel, S. L., Todd, R. F. y Weiss, S. J. (1991). Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254(5028): 99-102.
- Imoto, J. y Konishi, E. (2007). 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* 25(6): 1076-1084.
- Imrie, A., Meeks, J., Gurary, A., Sukhbaatar, M., Truong, T. T., Cropp, C. B. y Effler, P. (2007). Antibody to dengue 1 detected more than 60 years after infection. *Viral Immunol* 20(4): 672-675.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. y Shlomchik, M. J. (2005). *Immunobiology: the immune system in health and disease*. New York, Garland Science Publishing.
- Jessie, K., Fong, M. Y., Devi, S., Lam, S. K. y Wong, K. T. (2004). Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *J Infect Dis* 189(8): 1411-1418.
- Juffrie, M., Meer, G. M., Hack, C. E., Haasnoot, K., Sutaryo, Veerman, A. J. y Thijs, L. G. (2001). Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. *Am J Trop Med Hyg* 65(1): 70-75.
- Kanesa thanan, N., Sun, W., Kim Ahn, G., Van Albert, S., Putnak, J. R., King, A., Raengsakulrach, B., Christ Schmidt, H., Gilson, K., Zahradnik, J. M., Vaughn, D. W., Innis, B. L., Saluzzo, J. F. y Hoke, C. H., Jr. (2001). Safety and immunogenicity of attenuated dengue virus vaccines (Aventis Pasteur) in human volunteers. *Vaccine* 19(23-24): 3179-3188.
- Khanam, S., Etemad, B., Khanna, N. y Swaminathan, S. (2006a). 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* 74(2): 266-277.
- Khanam, S., Khanna, N. y Swaminathan, S. (2006b). Induction of neutralizing antibodies and T cell responses by dengue virus type 2 envelope domain III encoded by plasmid and adenoviral vectors. *Vaccine* 24(42-43): 6513-6525.
- Khanam, S., Rajendra, P., Khanna, N. y Swaminathan, S. (2007). An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. *BMC Biotechnol* 7(Feb 15): 10.
- Kliks, S. C., Nimmanitya, S., Nisalak, A. y Burke, D. S. (1988). Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg* 38(2): 411-419.

- Kliks, S. C., Nisalak, A., Brandt, W. E., Wahl, L. y Burke, D. S. (1989). Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 40(4): 444-451.
- Kochel, T. J., Watts, D. M., Halstead, S. B., Hayes, C. G., Espinoza, A., Felices, V., Caceda, R., Bautista, C. T., Montoya, Y., Douglas, S. y Russell, K. L. (2002). Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 360(9329): 310-312.
- Kochel, T. J., Watts, D. M., Gozalo, A. S., Ewing, D. F., Porter, K. R. y Russell, K. L. (2005). Cross-serotype neutralization of dengue virus in *Aotus nancymae* monkeys. *J Infect Dis* 191(6): 1000-1004.
- Konishi, E., Yamaoka, M., Kurane, I. y Mason, P. W. (2000). A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine* 18(11-12): 1133-1139.
- Konishi, E., Kosugi, S. y Imoto, J. (2006). Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. *Vaccine* 24(12): 2200-2207.
- Koraka, P., Benton, S., van Amerongen, G., Stittelaar, K. J. y Osterhaus, A. D. (2007a). Characterization of humoral and cellular immune responses in *cynomolgus macaques* upon primary and subsequent heterologous infections with dengue viruses. *Microbes Infect* 9(8): 940-946.
- Koraka, P., Benton, S., van Amerongen, G., Stittelaar, K. J. y Osterhaus, A. D. M. E. (2007b). Efficacy of a live attenuated tetravalent candidate dengue vaccine in naïve and previously infected *cynomolgus macaques*. *Vaccine* 25(29): 5409-5416.
- Kou, Z., Quinn, M., Chen, H., Rodrigo, W. W., Rose, R. C., Schlesinger, J. J. y Jin, X. (2008). Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 80(1): 134-146.
- Kouri, G., Mas, P., Guzman, M. G., Soler, M., Goyenechea, A. y Morier, L. (1983). Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: rapid diagnosis of the etiologic agent. *Bull Pan Am Health Organ* 17(2): 126-132.
- Kouri, G., Guzman, M. G., Valdes, L., Carbonel, I., del Rosario, D., Vazquez, S., Laferte, J., Delgado, J. y Cabrera, M. V. (1998). Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis* 4(1): 89-92.
- Kouri, G. P., Guzman, M. G. y Bravo, J. R. (1987). Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81(5): 821-823.
- Kouri, G. P., Guzman, M. G., Bravo, J. R. y Triana, C. (1989). Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ* 67(4): 375-380.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S. y Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108(5): 717-725.

- Lai, C. Y., Tsai, W. Y., Lin, S. R., Kao, C. L., Hu, H. P., King, C. C., Wu, H. C., Chang, G. J. y Wang, W. K. (2008). Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *J Virol* 82(13): 6631-6643.
- Laille, M. y Roche, C. (2004). Comparison of dengue-1 virus envelope glycoprotein gene sequences from French Polynesia. *Am J Trop Med Hyg* 71(4): 478-484.
- Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J. y Vorndam, A. V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(3): 545-551.
- Lanciotti, R. S., Lewis, J. G., Gubler, D. J. y Trent, D. W. (1994). Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol* 75 (Pt 1): 65-75.
- Lanciotti, R. S., Gubler, D. J. y Trent, D. W. (1997). Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol* 78 (Pt 9): 2279-2284.
- Laoprasopwattana, K., Libraty, D. H., Endy, T. P., Nisalak, A., Chunsuttiwat, S., Ennis, F. A., Rothman, A. L. y Green, S. (2007). Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication. *J Infect Dis* 195(8): 1108-1116.
- Lazo, L., Hermida, L., Zulueta, A., Sanchez, J., Lopez, C., Silva, R., Guillen, G. y Guzman, M. G. (2007). A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine* 25(6): 1064-1070.
- Lazo, L., Zulueta, A., Hermida, L., Blanco, A., Sánchez, J., Valdés, I., Gil, L., López, C., Romero, Y., Guzmán, M. G. y Guillén, G. (2009). Dengue-4 envelope domain III fused twice within the meningococcal P64k protein carrier induces partial protection in mice. *Biotechnol. Appl. Biochem* 52(Pt 4): 265-271.
- Leitmeyer, K. C., Vaughn, D. W., Watts, D. M., Salas, R., Villalobos, I., de, C., Ramos, C. y Rico-Hesse, R. (1999). Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73(6): 4738-4747.
- Leng, C. H., Liu, S. J., Tsai, J. P., Li, Y. S., Chen, M. Y., Liu, H. H., Lien, S. P., Yueh, A., Hsiao, K. N., Lai, L. W., Liu, F. C., Chong, P. y Chen, H. W. (2009). A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. *Microbes Infect* 11(2): 288-295.
- Libraty, D. H., Endy, T. P., Houn, H. S., Green, S., Kalayanarooj, S., Suntayakorn, S., Chansiriwongs, W., Vaughn, D. W., Nisalak, A., Ennis, F. A. y Rothman, A. L. (2002). Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis* 185(9): 1213-1221.
- Lin, B., Parrish, C. R., Murray, J. M. y Wright, P. J. (1994). Localization of a neutralizing epitope on the envelope protein of dengue virus type 2. *Virology* 202(2): 885-890.
- Lin, C. F., Chiu, S. C., Hsiao, Y. L., Wan, S. W., Lei, H. Y., Shiao, A. L., Liu, H. S., Yeh, T. M., Chen, S. H., Liu, C. C. y Lin, Y. S. (2005). Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol* 174(1): 395-403.

- Lindenbach, B. D. y Rice, C. M. (2001). *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. Fields Virology. Knippe, D. M. y Howley, P. M. London-New York-Tokyo, Lippincott Williams & Wilkins. 1: 991-1042.
- Lindenbach, B. D. y Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 59: 23-61.
- Lobigs, M., Arthur, C. E., Mullbacher, A. y Blanden, R. V. (1994). The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology* 202(1): 195-201.
- Loke, H., Bethell, D., Phuong, C. X., Day, N., White, N., Farrar, J. y Hill, A. (2002). Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg* 67(1): 102-106.
- Lopez, C., Sanchez, J., Hermida, L., Zulueta, A. y Marquez, G. (2004). Cysteine mediated multimerization of a recombinant dengue E fragment fused to the P64k protein following immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 34(2): 176-182.
- López, C., Gil, L., Lazo, L., Menéndez, I., Marcos, E., Sánchez, J., Valdés, I., Falcón, V., de la Rosa, M. C., Márquez, G., Guillén, G. y Hermida, L. (2009). In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus. *Arch Virol* 154(4): 695-698.
- Lozach, P. Y., Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sanchez, E., Harriague, J., Virelizier, J. L., Rey, F. A., Despres, P., Arenzana-Seisdedos, F. y Amara, A. (2005). DC-SIGN-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem* 280(25): 23698-23708.
- Markoff, L., Pang, X., Hough Hs, H. S., Falgout, B., Olsen, R., Jones, E. y Polo, S. (2002). Derivation and characterization of a dengue type 1 host range-restricted mutant virus that is attenuated and highly immunogenic in monkeys. *J Virol* 76(7): 3318-3328.
- Marovich, M., Grouard-Vogel, G., Louder, M., Eller, M., Sun, W., Wu, S. J., Putvatana, R., Murphy, G., Tassaneeritthep, B., Burgess, T., Birx, D., Hayes, C., Schlesinger-Frankel, S. y Mascola, J. (2001). Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Investig Dermatol Symp Proc* 6(3): 219-224.
- Martin, J., Hermida, L., Castro, J., Lazo, L., Martínez, R., Gil, L., Romero, Y., Puente, P., Zaragoza, S., Cosme, K., Guzmán, M. G., Cardoso, J. y Guillén, G. (2009). Viremia and antibody response in green monkey (*Chlorocebus aethiops sabaues*) infected with dengue virus type 2: a potential model for vaccine testing. *Microbiol Immunol* 112: 1-8.
- Martin, N. C., Pardo, J., Simmons, M., Tjaden, J. A., Widjaja, S., Marovich, M. A., Sun, W., Porter, K. R. y Burgess, T. H. (2006). An immunocytometric assay based on dengue infection via DC-SIGN permits rapid measurement of anti-dengue neutralizing antibodies. *J Virol Methods* 134(1-2): 74-85.

- Matsui, K., Gromowski, G. D., Li, L., Schuh, A. J., Lee, J. C. y Barrett, A. D. (2009). Characterization of dengue complex-reactive epitopes on dengue 3 virus envelope protein domain III. *Virology* 384: 16–20.
- Mazumder, R., Hu, Z. Z., Vinayaka, C. R., Sagripanti, J. L., Frost, S. D., Kosakovsky Pond, S. L. y Wu, C. H. (2007). Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. *Virus Genes* 35(2): 175-186.
- McArthur, J. H., Durbin, A. P., Marron, J. A., Wanionek, K. A., Thumar, B., Pierro, D. J., Schmidt, A. C., Blaney, J. E., Murphy, B. R. y Whitehead, S. S. (2008). Phase I clinical evaluation of rDEN4Delta30-200,201: a live attenuated dengue 4 vaccine candidate designed for decreased hepatotoxicity. *Am J Trop Med Hyg* 79(5): 678-684.
- McBride, W. J. y Bielefeldt Ohmann, H. (2000). Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2(9): 1041-1050.
- Megret, F., Hugnot, J. P., Falconar, A., Gentry, M. K., Morens, D. M., Murray, J. M., Schlesinger, J. J., Wright, P. J., Young, P., Van Regenmortel, M. H. y et al. (1992). Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. *Virology* 187(2): 480-491.
- Mehlhof, E., Ansarah-Sobrinho, C., Johnson, S., Engle, M., Fremont, D. H., Pierson, T. C. y Diamond, M. S. (2007). Complement protein C1q inhibits antibody-dependent enhancement of flavivirus infection in an IgG subclass-specific manner. *Cell Host Microbe* 2(6): 417-426.
- Men, R., Bray, M., Clark, D., Chanock, R. M. y Lai, C. J. (1996). Dengue type 4 virus mutants containing deletions in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in *rhesus* monkeys. *J Virol* 70(6): 3930-3937.
- Men, R., Wyatt, L., Tokimatsu, I., Arakaki, S., Shameem, G., Elkins, R., Chanock, R., Moss, B. y Lai, C. J. (2000). Immunization of *rhesus* monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine* 18(27): 3113-3122.
- Misra, A., Mukerjee, R. y Chaturvedi, U. C. (1996a). Release of reactive oxygen intermediates by dengue virus-induced macrophage cytotoxin. *Int J Exp Pathol* 77(5): 237-242.
- Misra, A., Mukerjee, R. y Chaturvedi, U. C. (1996b). Production of nitrite by dengue virus-induced cytotoxic factor. *Clin Exp Immunol* 104(3): 406-411.
- Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X. N., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., Sawasdivorn, S., Duangchinda, T., Dong, T., Rowland-Jones, S., Yenchitsomanus, P. T., McMichael, A., Malasit, P. y Screaton, G. (2003). Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 9(7): 921-927.

- Mongkolsapaya, J., Duangchinda, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S., Avirutnan, P., Jairungsri, A., Khemnu, N., Tangthawornchaikul, N., Chotiyarnwong, P., Sae-Jang, K., Koch, M., Jones, Y., McMichael, A., Xu, X., Malasit, P. y Sreaton, G. (2006). T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol* 176(6): 3821-3829.
- Moreno Altamirano, M. M. B., Sanchez Garcia, F. J. y Munoz, M. L. (2002). Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J Gen Virol* 83(Pt 5): 1123-1130.
- Morens, D. M., Halstead, S. B., Repik, P. M., Putvatana, R. y Raybourne, N. (1985). Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 22(2): 250-254.
- Mota, J., Acosta, M., Argotte, R., Figueroa, R., Mendez, A. y Ramos, C. (2005). Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. *Vaccine* 23(26): 3469-3476.
- Mul, F. P., Zuurbier, A. E., Janssen, H., Calafat, J., van Wetering, S., Hiemstra, P. S. y al., e. (2000). Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. *J Leukoc Biol* 68(4): 529-537.
- Murgue, B., Roche, C., Chungue, E. y Deparis, X. (2000). Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996-1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. *J Med Virol* 60(4): 432-438.
- Nguyen, T. H., Lei, H. Y., Nguyen, T. L., Lin, Y. S., Huang, K. J., Le, B. L., Lin, C. F., Yeh, T. M., Do, Q. H., Vu, T. Q., Chen, L. C., Huang, J. H., Lam, T. M., Liu, C. C. y Halstead, S. B. (2004). Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. *J Infect Dis* 189(2): 221-232.
- Nimmannitya, S. (1998). Dengue and Dengue Haemorrhagic fever. *Manson's Tropical Diseases*. Cook, G. C. London, Saunders WB.
- Nishioka, K. (1974). Serum complement level in dengue hemorrhagic fever. *Allerg Immunol (Leipz)* 20-21(4): 385-392.
- Nowak, T. y Wengler, G. (1987). Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. *Virology* 156(1): 127-137.
- Okuno, Y., Fukunaga, T., Tadano, M., Fukai, K., Ikeda, T., Sekii, K. y Ariyoshi, H. (1983). Serological studies on volunteers inoculated experimentally with a dengue virus strain in 1943. *Biken J* 26(4): 161-163.
- OMS (2008). Impacto del Dengue. <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>. Fecha de acceso: 21 de Noviembre de 2008.
- Pacsa, A. S., Agarwal, R., Elbishbishi, E. A., Chaturvedi, U. C., Nagar, R. y Mustafa, A. S. (2000). Role of interleukin-12 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol* 28(2): 151-155.
- Papaevangelou, G. y Halstead, S. B. (1977). Infections with two dengue viruses in Greece in the 20th century. Did dengue hemorrhagic fever occur in the 1928 epidemic? *J Trop Med Hyg* 80(3): 46-51.

- Pelaez, O., Guzman, M. G., Kouri, G., Perez, R., San Martin, J. L., Vazquez, S., Rosario, D., Mora, R., Quintana, I., Bisset, J., Cancio, R., Masa, A. M., Castro, O., Gonzalez, D., Avila, L. C., Rodriguez, R., Alvarez, M., Pelegrino, J. L., Bernardo, L. y Prado, I. (2004). Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis* 10(4): 719-722.
- Perez, A., Dickinson, F., Cinza, Z., Ruiz, A., Serrano, T., Sosa, J., González, S., Gutiérrez, Y., Nazábal, C. y Gutiérrez, O. (2001). Safety and preliminary immunogenicity of the recombinant outer membrane protein P64k of *Neisseria meningitidis* in human volunteers. *Biotechnol Appl Biochem* 34(Pt 2): 121-125.
- Pryor, M. J., Carr, J. M., Hocking, H., Davidson, A. D., Li, P. y Wright, P. J. (2001). Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* 65(5): 427-434.
- Putnak, R. J., Collier, B. A., Voss, G., Vaughn, D. W., Clements, D., Peters, I., Bignami, G., Houg, H. S., Chen, R. C., Barvir, D. A., Seriwatana, J., Cayphas, S., Garcon, N., Gheysen, D., Kanesa-Thasan, N., McDonell, M., Humphreys, T., Eckels, K. H., Prieels, J. P. y Innis, B. L. (2005). An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the *rhesus macaque* model. *Vaccine* 23(35): 4442-4452.
- Rabablert, J. y Yoksan, S. (2009). Attenuated D2 16681-PDK53 vaccine: defining humoral and cell-mediated immunity. *Curr Pharm Des* 15(11): 1203-1211.
- Raghupathy, R., Chaturvedi, U. C., Al-Sayer, H., Elbishbishi, E. A., Agarwal, R., Nagar, R., Kapoor, S., Misra, A., Mathur, A., Nusrat, H., Azizieh, F., Khan, M. A. y Mustafa, A. S. (1998). Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol* 56(3): 280-285.
- Raja, N. U., Holman, D. H., Wang, D., Raviprakash, K., Juompan, L. Y., Deitz, S. B., Luo, M., Zhang, J., Porter, K. R. y Dong, J. Y. (2007). Induction of bivalent immune responses by expression of dengue virus type 1 and type 2 antigens from a single complex adenoviral vector. *Am J Trop Med Hyg* 76(4): 743-751.
- Raviprakash, K., Porter, K. R., Kochel, T. J., Ewing, D., Simmons, M., Phillips, I., Murphy, G. S., Weiss, W. R. y Hayes, C. G. (2000). Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in *rhesus macaques*. *J Gen Virol* 81(Pt 7): 1659-1667.
- Raviprakash, K., Marques, E., Ewing, D., Lu, Y., Phillips, I., Porter, K. R., Kochel, T. J., August, T. J., Hayes, C. G. y Murphy, G. S. (2001). Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. *Virology* 290(1): 74-82.
- Raviprakash, K., Ewing, D., Simmons, M., Porter, K. R., Jones, T. R., Hayes, C. G., Stout, R. y Murphy, G. S. (2003). Needle-free Biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene

- increases immunogenicity and protection from virus challenge in *Aotus* monkeys. *Virology* 315(2): 345-352.
- Raviprakash, K., Apt, D., Brinkman, A., Skinner, C., Yang, S., Dawes, G., Ewing, D., Wu, S. J., Bass, S., Punnonen, J. y Porter, K. (2006). A chimeric tetravalent dengue DNA vaccine elicits neutralizing antibody to all four virus serotypes in *rhesus macaques*. *Virology* 353(1): 166-173.
- Raviprakash, K., Wang, D., Ewing, D., Holman, D. H., Block, K., Woraratanadharm, J., Chen, L., Hayes, C., Dong, J. Y. y Porter, K. (2008). A tetravalent dengue vaccine based on a complex adenovirus vector provides significant protection in *rhesus* monkeys against all four serotypes of dengue virus. *J Virol* 82(14): 6927-6934.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C. y Harrison, S. C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375(6529): 291-298.
- Rey, F. A. (2003). Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12): 6899-6901.
- Rico-Hesse, R. (2007). Dengue virus evolution and virulence models. *Clin Infect Dis* 44(11): 1462-1466.
- Rodriguez-Roche, R., Alvarez, M., Guzman, M. G., Morier, L. y Kouri, G. (2000). Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol* 38(9): 3508-3510.
- Rodriguez-Roche, R., Alvarez, M., Gritsun, T., Rosario, D., Halstead, S., Kouri, G., Gould, E. A. y Guzman, M. G. (2005). Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of E gene sequence in isolates obtained at different times during the epidemic. *Arch Virol* 150(3): 415-425.
- Roehrig, J. T., Bolin, R. A. y Kelly, R. G. (1998). Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* 246(2): 317-328.
- Roehrig, J. T., Hombach, J. y Barrett, A. D. (2008). Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol.*
- Rosario, D., Alvarez, M., Diaz, J., Contreras, R., Rodriguez, R., Vazquez, S. y Guzman, M. G. (1998a). [Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples]. *Rev Panam Salud Publica* 4(1): 1-5.
- Rosario, D., Alvarez, M., Diaz, J., Contreras, R., Rodriguez, R., Vazquez, S. y Guzman, M. G. (1998b). Reaccion en cadena de la polimerasa para la deteccion rapida y determinacion del serotipo de virus del dengue en muestras clinicas. [Polymerase chain reaction for rapid detection and serotyping of dengue virus in clinical samples]. *Rev Panam Salud Publica* 4(1): 1-5.
- Rosen, L. (1986). [Pathogenesis of hemorrhagic dengue: critical discussion of current hypotheses]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 79(3): 342-349.
- Rothman, A. L. y Ennis, F. A. (1999). Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257(1): 1-6.
- Sabchareon, A., Lang, J., Chanthavanich, P., Yoksan, S., Forrat, R., Attanath, P., Sirivichayakul, C., Pengsaa, K., Pojjaroen-Anant, C., Chambonneau, L., Saluzzo,

- J. F. y Bhamarapavati, N. (2004). Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. *Pediatr Infect Dis J* 23(2): 99-109.
- Sabin, A. B. (1952). Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1(1): 30-50.
- Saejung, W., Fujiyama, K., Takasaki, T., Ito, M., Hori, K., Malasit, P., Watanabe, Y., Kurane, I. y Seki, T. (2007). Production of dengue 2 envelope domain III in plant using TMV-based vector system. *Vaccine* 25(36): 6646-6654.
- Sanchez, V., Gimenez, S., Tomlinson, B., Chan, P. K., Thomas, G. N., Forrat, R., Chambonneau, L., Deauvieu, F., Lang, J. y Guy, B. (2006). Innate and adaptive cellular immunity in flavivirus-naive human recipients of a live-attenuated dengue serotype 3 vaccine produced in Vero cells (VDV3). *Vaccine* 24(23): 4914-4926.
- Sariol, C. A., Munoz-Jordan, J. L., Abel, K., Rosado, L. C., Pantoja, P., Giavedoni, L., Rodriguez, I. V., White, L. J., Martinez, M., Arana, T. y Kraiselburd, E. N. (2007). Transcriptional activation of interferon-stimulated genes but not of cytokine genes after primary infection of *rhesus macaques* with dengue virus type 1. *Clin Vaccine Immunol* 14(6): 756-766.
- Schlesinger, J. J., Brandriss, M. W. y Walsh, E. E. (1987). Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol* 68 (Pt 3): 853-857.
- Shao, M. F., Chang, F. Y. y Hou, S. C. (1992). Complement pathway activity in serum from patients with classical dengue fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86(6): 672-675.
- Shi, Y. J., Jiang, Z. Y. y Zeng, K. (2006). [Effect of IL-6 and TNF-alpha on Dengue virus infection of human dendritic cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 22(4): 469-471.
- Shresta, S., Sharar, K. L., Prigozhin, D. M., Beatty, P. R. y Harris, E. (2006). Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol* 80(20): 10208-10217.
- Sierra, B., Garcia, G., Perez, A. B., Morier, L., Rodriguez, R., Alvarez, M. y Guzman, M. G. (2002). Long-term memory cellular immune response to dengue virus after a natural primary infection. *Int J Infect Dis* 6(2): 125-128.
- Sierra, B., Alegre, R., Perez, A. B., Garcia, G., Sturn-Ramirez, K., Obasanjo, O., Aguirre, E., Alvarez, M., Rodriguez-Roche, R., Valdes, L., Kanki, P. y Guzman, M. G. (2007). HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele frequencies in Cuban individuals with antecedents of dengue 2 disease: advantages of the Cuban population for HLA studies of dengue virus infection. *Hum Immunol* 68(6): 531-540.
- Sim, A. C., Lin, W., Tan, G. K., Sim, M. S., Chow, V. T. y Alonso, S. (2008). Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen. *Vaccine* 26(9): 1145-1154.

- Simasathien, S., Thomas, S. J., Watanaveeradej, V., Nisalak, A., Barberousse, C., Innis, B. L., Sun, W., Putnak, J. R., Eckels, K. H., Hutagalung, Y., Gibbons, R. V., Zhang, C., De La Barrera, R., Jarman, R. G., Chawachalalai, W. y Mammen, M. P., Jr. (2008). Safety and Immunogenicity of a Tetravalent Live-attenuated Dengue Vaccine in Flavivirus Naive Children. *Am J Trop Med Hyg* 78(3): 426-433.
- Simmons, M., Nelson, W. M., Wu, S. J. y Hayes, C. G. (1998). Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. *Am J Trop Med Hyg* 58(5): 655-662.
- Simmons, M., Murphy, G. S. y Hayes, C. G. (2001a). Short report: Antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 65(2): 159-161.
- Simmons, M., Murphy, G. S., Kochel, T., Raviprakash, K. y Hayes, C. G. (2001b). Characterization of antibody responses to combinations of a dengue-2 DNA and dengue-2 recombinant subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 65(5): 420-426.
- Simmons, M., Porter, K. R., Hayes, C. G., Vaughn, D. W. y Putnak, R. (2006). Characterization of antibody responses to combinations of a dengue virus type 2 DNA vaccine and two dengue virus type 2 protein vaccines in *rhesus macaques*. *J Virol* 80(19): 9577-9585.
- Solomon, T., Dung, N. M., Vaughn, D. W., Kneen, R., Thao, L. T., Raengsakulrach, B., Loan, H. T., Day, N. P., Farrar, J., Myint, K. S., Warrell, M. J., James, W. S., Nisalak, A. y White, N. J. (2000). Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet* 355(9209): 1053-1059.
- Soundravally, R. y Hoti, S. L. (2007a). Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. *Hum Immunol* 68(12): 973-979.
- Soundravally, R. y Hoti, S. L. (2007b). Significance of Transporter Associated with Antigen Processing 2 (TAP2) Gene Polymorphisms in Susceptibility to Dengue Viral Infection. *J Clin Immunol* 28(3): 256-262.
- Soundravally, R. y Hoti, S. L. (2008). Polymorphisms of the TAP 1 and 2 gene may influence clinical outcome of primary dengue viral infection. *Scand J Immunol* 67(6): 618-625.
- Souza, L. J., Alves, J. G., Nogueira, R. M., Gicovate Neto, C., Bastos, D. A., Siqueira, E. W., Souto Filho, J. T., Cezario Td Tde, A., Soares, C. E. y Carneiro Rd Rda, C. (2004). Aminotransferase changes and acute hepatitis in patients with dengue fever: analysis of 1,585 cases. *Braz J Infect Dis* 8(2): 156-163.
- Speidel, K., Osen, W., Faath, S., Hilgert, I., Obst, R., Braspenning, J., Momburg, F., Hammerling, G. J. y Rammensee, H. G. (1997). Priming of cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens *in vivo*: conditions, efficiency, and relation to antibody responses. *Eur J Immunol* 27(9): 2391-2399.
- Srichaikul, T. y Nimmannitya, S. (2000). Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13(2): 261-276.

- Srivastava, A. K., Putnak, J. R., Warren, R. L. y Hoke, C. H., Jr. (1995). Mice immunized with a dengue type 2 virus E and NS1 fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal dengue virus infection. *Vaccine* 13(13): 1251-1258.
- Stiasny, K., Allison, S. L., Marchler Bauer, A., Kunz, C. y Heinz, F. X. (1996). Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. *J Virol* 70(11): 8142-8147.
- Sukupolvi-Petty, S., Austin, S. K., Purtha, W. E., Oliphant, T., Nybakken, G. E., Schlesinger, J. J., Roehrig, J. T., Gromowski, G. D., Barrett, A. D., Fremont, D. H. y Diamond, M. S. (2007). Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J Virol* 81(23): 12816-12826.
- Sun, W., Edelman, R., Kanesa-Thasan, N., Eckels, K. H., Putnak, J. R., King, A. D., Houg, H. S., Tang, D., Scherer, J. M., Hoke, C. H., Jr. y Innis, B. L. (2003). Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. *Am J Trop Med Hyg* 69(6 Suppl): 24-31.
- Sun, W., Cunningham, D., Wasserman, S. S., Perry, J., Putnak, J. R., Eckels, K. H., Vaughn, D. W., Thomas, S. J., Kanesa-Thasan, N., Innis, B. L. y Edelman, R. (2009). Phase 2 clinical trial of three formulations of tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naïve adults. *Hum Vaccin* 5(1): 33-40.
- Tadano, M., Okuno, Y., Fukunaga, T. y Fukai, K. (1983). Retrospective serological studies on dengue epidemics in Osaka and Okinawa. *Biken J* 26(4): 165-167.
- Thepparit, C. y Smith, D. R. (2004). Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol* 78(22): 12647-12656.
- Thomas, S. J., Hombach, J. y Barrett, A. (2009). Scientific consultation on cell mediated immunity (CMI) in dengue and dengue vaccine development. *Vaccine* 27(3): 355-368.
- Twiddy, S. S., Farrar, J. J., Vinh Chau, N., Wills, B., Gould, E. A., Gritsun, T., Lloyd, G. y Holmes, E. C. (2002). Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology* 298(1): 63-72.
- van Der Most, R. G., Murali-Krishna, K., Ahmed, R. y Strauss, J. H. (2000). Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J Virol* 74(17): 8094-8101.
- Vaughn, D. W., Green, S., Kalayanaraj, S., Innis, B. L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T. P., Raengsakulrach, B., Rothman, A. L., Ennis, F. A. y Nisalak, A. (2000). Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181(1): 2-9.
- Vejbaesya, S., Luangtrakool, P., Luangtrakool, K., Kalayanaraj, S., Vaughn, D. W., Endy, T. P., Mammen, M. P., Green, S., Libraty, D. H., Ennis, F. A., Rothman, A. L. y Stephens, H. A. (2009). TNF and LTA Gene, Allele, and Extended HLA Haplotype Associations with Severe Dengue Virus Infection in Ethnic Thais. *J Infect Dis* 199(10): 1442-1448.

- Velzing, J., Groen, J., Drouet, M. T., van Amerongen, G., Copra, C., Osterhaus, A. D. y Deubel, V. (1999). Induction of protective immunity against Dengue virus type 2: comparison of candidate live attenuated and recombinant vaccines. *Vaccine* 17(11-12): 1312-1320.
- Venkata Sai, P. M., Dev, B. y Krishnan, R. (2005). Role of ultrasound in dengue fever. *Br J Radiol* 78(929): 416-418.
- Volk, D. E., Lee, Y. C., Li, X., Thivyanathan, V., Gromowski, G. D., Li, L., Lamb, A. R., Beasley, D. W., Barrett, A. D. y Gorenstein, D. G. (2007). Solution structure of the envelope protein domain III of dengue-4 virus. *Virology* 364(1): 147-154.
- Wang, S., He, R. y Anderson, R. (1999). PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J Virol* 73(3): 2547-2551.
- Wang, W. K., Chao, D. Y., Kao, C. L., Wu, H. C., Liu, Y. C., Li, C. M., Lin, S. C., Ho, S. T., Huang, J. H. y King, C. C. (2003). High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology* 305(2): 330-338.
- Westaway, E. G., Mackenzie, J. M., Kenney, M. T., Jones, M. K. y Khromykh, A. A. (1997). Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol* 71(9): 6650-6661.
- Westaway, E. G., Khromykh, A. A. y Mackenzie, J. M. (1999). Nascent flavivirus RNA colocalized in situ with double-stranded RNA in stable replication complexes. *Virology* 258(1): 108-117.
- Whitehead, S. S., Falgout, B., Hanley, K. A., Blaney Jr, J. E., Jr., Markoff, L. y Murphy, B. R. (2003a). A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *J Virol* 77(2): 1653-1657.
- Whitehead, S. S., Hanley, K. A., Blaney, J. E., Jr., Gilmore, L. E., Elkins, W. R. y Murphy, B. R. (2003b). Substitution of the structural genes of dengue virus type 4 with those of type 2 results in chimeric vaccine candidates which are attenuated for mosquitoes, mice, and *rhesus* monkeys. *Vaccine* 21(27-30): 4307-4316.
- Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P. y Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 5(7): 518-528.
- Yamanaka, A., Kosugi, S. y Konishi, E. (2008). Infection-enhancing and -neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *J Virol* 82(2): 927-937.
- Yauch, L. E. y Shresta, S. (2008). Mouse models of dengue virus infection and disease. *Antiviral Res* 80(2): 87-93.
- Yauch, L. E., Zellweger, R. M., Kotturi, M. F., Qutubuddin, A., Sidney, J., Peters, B., Prestwood, T. R., Sette, A. y Shresta, S. (2009). A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J Immunol* 182(8): 4865-4873.

- Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P. R., Zhang, W., Pletnev, S. V., Sedlak, D., Baker, T. S., Strauss, J. H., Kuhn, R. J. y Rossmann, M. G. (2003). Structures of immature flavivirus particles. *Embo J* 22(11): 2604-2613.
- Zulueta, A., Hermida, L., Lazo, L., Valdes, I., Rodriguez, R., Lopez, C., Silva, R., Rosario, D., Martin, J., Guzman, M. G. y Guillen, G. (2003). The fusion site of envelope fragments from each serotype of Dengue virus in the P64k protein, influence some parameters of the resulting chimeric constructs. *Biochem Biophys Res Commun* 308(3): 619-626.
- Zulueta, A., Martin, J., Hermida, L., Alvarez, M., Valdes, I., Prado, I., China, G., Rosario, D., Guillen, G. y Guzman, M. G. (2006). Amino acid changes in the recombinant Dengue 3 Envelope domain III determine its antigenicity and immunogenicity in mice. *Virus Res* 121(1): 65-73.

9. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS

Publicaciones:

- **Bernardo L**, Izquierdo A, Alvarez M, Rosario D, Prado I, López C, Martínez R, Castro J, Santana E, Hermida L, Guillen G and Guzmán MG. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 1 envelope protein in nonhuman primates. *Antiviral Research*. **2008**;80(2):194-9
- **Bernardo L**, Hermida L, Martin J, Alvarez M, Prado I, López C, Martínez R, Rodríguez-Roche R, Zulueta A, Lazo L, Rosario D, Guillén G and Guzmán MG. Anamnestic antibody response after viral challenge in monkeys immunized with Dengue 2 recombinant fusion proteins. *Archive of virology*. **2008**; 153(5):849-54
- **Bernardo L**, Izquierdo A, Prado I, Rosario D, Alvarez M, Santana E, Castro J, Martínez R, Rodríguez R, Morier L, Guillén G and Guzmán MG. Primary and secondary infections by Asian and American genotypes of dengue 2 virus in *Macaca fascicularis* monkeys. *Clin Vaccine Immunol*. **2008**; 15(3):439-46
- Izquierdo A, **Bernardo L**, Martin J, Santana E, Hermida L, Guillén G, Guzmán MG. Serotype-specificity of recombinant fusion proteins containing domain III of dengue virus. *Virus Res*. **2008**; 138(1-2):135-8

Eventos Científicos donde se presentaron los resultados que forman parte de este trabajo:

1. 6th Congreso Latinoamericano de Inmunología (ALAI). 3rd Congreso Cubano de Inmunología. Ciudad de la Habana, Cuba, Diciembre 2002
2. XVI Congreso Latino Americano de Microbiología (ALAM), VI Conferencia Cubana de Microbiología y Parasitología, III Conferencia Cubana de Medicina Tropical. IPK, Ciudad Habana, Cuba. Noviembre 2002.
3. Congreso Internacional Biotecnología Habana 2003. CIGB, Ciudad de la Habana, Cuba. Noviembre 2003.
4. Congreso Internacional de Dengue y Fiebre Amarilla. Palacio de las Convenciones, Ciudad de la Habana, Cuba. Junio 2004.
5. IV Congreso Nacional de Inmunología. ISCM, Santa Clara, Cuba. Noviembre 2004.
6. 2nd Asian Regional Dengue Research Network Meeting. Singapur. Septiembre, 2005
7. 3rd Internacional Workshop on Vaccine Adjuvants and Glycoconjugates. Varadero. Abril, 2006.
8. Taller Internacional de Dengue. Ciudad de la Habana. Agosto, 2007.
9. VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina tropical. Ciudad de la Habana. Noviembre, 2007.
10. Vaccipharma 2009. Varadero. Mayo, 2009.
11. Congreso 70 Aniversario del IPK, VII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología, IV Congreso Nacional de Medicina tropical. Ciudad de la Habana. Junio, 2009.