

Vacunas contra el virus dengue: desarrollo histórico

Alicia Aguilar, Nevis Amin, Ela María Pérez

Instituto Finlay. Centro de Investigación Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.
E-mail: elaperez@finlay.edu.cu.

La Fiebre del Dengue (FD) y la Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) han emergido como la principal enfermedad viral transmitida por artrópodos que afecta al hombre. Las características de la enfermedad, la ausencia de drogas antivirales contra la misma, el incremento en el número de enfermos, de países afectados y la dificultad para el control del vector han convertido el desarrollo de vacunas contra el dengue en una prioridad para la salud pública mundial. Los intentos para lograr este objetivo datan de mediados del siglo pasado para lo cual han sido exploradas diferentes estrategias. A pesar de los avances realizados al respecto mucho queda por aclarar y definir para disponer de un inmunógeno contra el virus.

Palabras claves: dengue, vacuna

Introducción

La Fiebre del Dengue (FD) y su forma severa, la Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD)/ Síndrome de Choque por Dengue (SCD) son producidas por el virus Dengue perteneciente a la familia *Flaviviridae*, género flavivirus y del cual existen cuatro serotipos; dicho virus es envuelto, su genoma está constituido por una molécula de ARN de simple cadena y polaridad positiva y es transmitido mediante un ciclo que involucra los humanos y mosquitos del género *Aedes* donde el *Aedes aegypti* es el principal vector (1,2).

La FHD ha sido más comúnmente reportada en infecciones secundarias que primarias (3,4) y aunque su patogénesis no ha sido lo suficientemente estudiada, la teoría más difundida que ha tratado de explicarla es la inmunoamplificación dependiente de anticuerpos, según la cual la primoinfección por un serotipo del virus es capaz de inducir inmunidad homóloga de por vida ante infecciones por este mismo serotipo, sin embargo, durante infecciones secundarias, concentraciones subneutralizantes de dichos anticuerpos son capaces de reconocer un serotipo heterólogo y formar inmunocomplejos virus-anticuerpo que facilitan la entrada del virus a la célula diana (monocitos) a través de la unión del fragmento Fc de la inmunoglobulina y el receptor Fc celular (5). Ha sido planteado que durante las infecciones secundarias los linfocitos T de memoria (CD⁴⁺ y CD⁸⁺) de reactividad cruzada pueden activarse y conducir a una liberación de citoquinas y mediadores químicos que consecuentemente pueden inducir un aumento de la permeabilidad vascular con salida de plasma y

choque, así como problemas en la coagulación de la sangre y hemorragias descritos en el cuadro hemorrágico (6). Factores dependientes del hospedero (3) así como inherentes al agente viral (7) podrían estar involucrados en la mayor susceptibilidad de un individuo a desarrollar un cuadro severo.

El deterioro de los programas de control del vector, la urbanización no planificada, el crecimiento acelerado de la población, el incremento del tráfico aéreo y la existencia de una infraestructura de salud deteriorada en muchos países han conducido a que la FD y la FHD hayan emergido como las principales enfermedades virales transmitidas por artrópodos que afectan al hombre (8). Se estima que en el mundo se producen anualmente entre 50 y 100 000 000 de casos de FD y entre 250 000 y 500 000 FHD (9). Esto unido a las características de la enfermedad, la ausencia de drogas antivirales contra la misma, el incremento paulatino en el número de enfermos así como el incremento estimado para los próximos años, no sólo en epidemias y casos de FD y FHD sino también en el número de países afectados y los problemas para el control del vector que dificultan a su vez el control y eliminación de la enfermedad, ha hecho que sea considerada cada vez más urgente la necesidad de contar con una vacuna segura y efectiva contra el virus (10).

En el presente trabajo presentamos una actualización sobre los principales candidatos vacunales que se han desarrollado contra el virus y se abordan los principales obstáculos que han atentado contra el desarrollo de los mismos.

VACUNAS CONTRA DENGUE

En 1984 fue creado, por el director general de la OMS, un comité para el desarrollo de vacunas contra Dengue cuyo objetivo era chequear la marcha del programa de vacunas atenuadas que se estaba llevando a cabo y estimular la participación de diferentes laboratorios en el desarrollo de vacunas contra dicho patógeno mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante (11).

Aunque varios grupos de avanzada se incorporaron al desarrollo de tal objetivo (12) no existe todavía una vacuna contra Dengue disponible en el mercado. Varios son los problemas que han incidido en el desarrollo de las mismas, entre los cuales se destacan la replicación insuficiente de estos virus como para formular una vacuna inactivada económica, la no existencia de un modelo animal que reproduzca los síntomas que provoca la enfermedad en humanos y el hecho de que para lograr una vacuna satisfactoria, ésta debe ser tetravalente para evitar la inducción de immunoamplificación durante infecciones subsecuentes por serotipos heterólogos y así minimizar el riesgo de FHD/SCD (13). Otro factor a tener en cuenta es la posibilidad de que surjan nuevas variantes del virus que puedan burlar la inmunidad inducida por la vacuna (14).

Por otra parte no se cuenta con una vía perfecta para desarrollar una vacuna ya que todas las estrategias existentes hasta el momento presentan ventajas y desventajas.

Vacunas atenuadas

Los primeros candidatos vacunales que se obtuvieron contra el Dengue fueron virus vivos atenuados mediante el pase seriado de cepas de virus Dengue en cerebro de ratón lactante (13), estos trabajos permitieron demostrar que con esta metodología era posible lograr la atenuación (15, 16, 17) y que la administración de dichos candidatos en humanos fue capaz de inducir inmunidad tipo específica (18,17). No obstante, estos trabajos de vacunas en cerebro de ratón se abandonaron debido a la alta reactogenicidad de las mismas (13).

El descubrimiento de la habilidad del virus de propagarse en cultivos celulares dirigió la atención de los investigadores a la obtención de vacunas atenuadas en sustratos celulares (13). Los primeros pasos en esta dirección se dieron en el Instituto Walter Reed; el criterio que se utilizó para seleccionar las cepas como posibles candidatos vacunales atenuados se basó en el estudio de marcadores fenotípicos que permitieran

distinguir el crecimiento del candidato vacunal y la cepa parental (19). Estos marcadores incluyeron: dificultad del virus de crecer a temperaturas entre 37 °C y 39 °C, formación de placas de pequeño tamaño en líneas celulares continuas de monos, y disminución de la neurovirulencia en ratones y de la viremia en monos. En todos estos trabajos se llevó a cabo una selección clonal de las cepas propuestas como candidatos, con el objetivo de evitar la mezcla de subpoblaciones heterogéneas de virus, garantizando así la existencia de poblaciones homogéneas en las mismas (20).

El primer producto obtenido fue el PR - 159/ S-1 contra virus Dengue tipo 2, el cual se administró a más de 100 personas (21), fue moderadamente inmunogénico (61% de seroconversión en no vacunados contra Fiebre Amarilla) y resultó estar suficientemente atenuado (22).

Los posteriores ensayos de candidatos vacunales contra Dengue 4 (23), Dengue 1 (24) y Dengue 3 (25) fueron desalentadores, pues resultaron insuficientemente inmunogénicos o patogénicos para los voluntarios y los marcadores fenotípicos de atenuación no se mantuvieron estables.

Años después se retomó el trabajo con la cepa de Dengue 1 atenuada por Mc Kee y col. en 1987 (26), la cual fue sometida a pases seriados en células de cultivo primario de riñón de perro Beagle (RPB). Los pases 10, 20 y 27 se utilizaron en ensayos en humanos. La mejor seroconversión y menor reactogenicidad se obtuvo con el pase 20, proponiéndose su posible utilización para inmunizar a adultos que viajan a áreas con riesgo de transmisión de Dengue 1.

Marchette y col. en 1990 (27), desarrollaron otro candidato vacunal contra Dengue 4 mediante pases seriados sin selección clonal en células RPB. Posteriormente Hoke y col., en 1990 (28) reportaron que la aplicación de éste en humanos indujo anticuerpos neutralizantes en 5 de 8 vacunados.

Por otra parte, un grupo de investigadores en la Universidad de Mahidol en Bangkok desarrollaron candidatos vacunales a partir de virus pasados en células RPB (Dengue 1, 2 y 4) y en células de cultivo primario de riñón de mono verde africano (PGMK) (Dengue 3) hasta que sus características fenotípicas difirieran de las del parental, estas características fueron: reducción del tamaño de placas, sensibilidad a la temperatura, neurovirulencia en ratones y habilidad de crecer en monocitos humanos así como causar

viremia en monos. Estos virus no fueron sometidos a la selección clonal (13).

Estos candidatos vacunales vivos atenuados fueron desarrollados contra los cuatro serotipos; la administración de preparaciones monovalentes de los mismos a voluntarios no inmunes a flavivirus indujo en ellos la producción de anticuerpos neutralizantes entre los días 30 y 60 postinoculación y la mayoría de ellos mostró un título de anticuerpos neutralizantes mayor que 1/10 a los dos años después de haber sido inoculados, por otra parte dichos voluntarios no desarrollaron la enfermedad y sólo desarrollaron síntomas menores y de tipo transitorio (29).

La posterior aplicación a humanos de candidatos vacunales bivalentes (Dengue 2 y 4; Dengue 1 y 4 y Dengue 1 y 2) fue capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes contra los serotipos administrados hasta 6 meses posinmunización, de igual forma al ser administrado el candidato trivalente (Dengue 1, 2 y 4) se detectaron anticuerpos neutralizantes contra dichos serotipos hasta dos años después de la inmunización. Para el caso de aquellos voluntarios que recibieron preparaciones tetravalentes la mayoría desarrolló anticuerpos neutralizantes contra los 4 serotipos y algunos sólo contra tres de ellos (29).

Los estudios de Fase I de esta vacuna se llevaron a cabo en Estados Unidos por el Instituto Walter Reed, los de Fase II se realizaron en Tailandia donde se obtuvo una alta seroconversión con un mínimo de reactogenicidad después de ser aplicada una segunda dosis de inmunización. En noviembre de 1999 comenzaron a realizarse ensayos en niños de 5 a 14 años (29).

Álvarez y col en 2001 (30), sometieron la cepa cubana A15 de Dengue 2 a pases seriados en células RPB obteniéndose cambios fenotípicos en la misma como sensibilidad a la temperatura, formación de placas de pequeño tamaño, reducción de neurovirulencia en ratones y disminución de efecto citopático en líneas celulares permisivas, este resultado es de gran importancia en relación con la atenuación de dicha cepa y por tanto para el desarrollo de vacunas.

Estas vacunas desarrolladas contra Dengue presentan los mismos inconvenientes que el resto de las vacunas vivas atenuadas, son lábiles a los cambios de temperatura, su posible reversión a la virulencia, interferencia con la infección natural y atenuación insuficiente. Así como comparten sus principales ventajas, generan una inmunidad protectora a largo plazo y se necesita una cantidad mínima de antígeno

para producir una buena respuesta protectora ya que el virus es capaz de replicarse (31).

Vacunas inactivadas

Aunque el desarrollo de vacunas inactivadas contra Dengue no ha sido muy explotado debido a la pobre replicación del virus en cultivos celulares, esta vía no ha sido completamente desechada. Putnak y col. (32) desarrollaron un candidato vacunal inactivado contra Dengue 2 en células de pulmón fetal de monos rhesus y evaluaron la respuesta en ratones obteniendo altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra el serotipo homólogo y protección parcial en dichos ratones. Otro candidato del mismo virus se desarrolló en células Vero el cual indujo altos títulos de anticuerpos neutralizantes en ratones y monos rhesus. Los ratones inmunizados fueron completamente protegidos ante un reto con la cepa salvaje y los monos vacunados mostraron una significativa reducción en los días de viremia al ser retados con la cepa salvaje (33).

Empleo de vectores infecciosos

La ingeniería genética también ha sido ampliamente utilizada para la obtención de un inmunógeno contra el virus (34). Una de las estrategias que se ha seguido ha sido la utilización de vectores infecciosos como vaccinia y otros poxvirus relacionados para expresar genes del virus; varios de estos recombinantes han sido probados en animales (34).

Bray y col. en 1989 (35) reportaron la protección contra encefalitis letal en ratones inoculados con vaccinia recombinante que expresaba el gen de la proteína E de Dengue 4, ya fuera solo o asociado a los que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales, sin embargo estos recombinantes no indujeron respuesta de anticuerpos neutralizantes en los ratones.

Otros autores obtuvieron respuesta de anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación en ratones inoculados con vaccinia recombinante que coexpresaron las proteínas prM y E de Dengue 1 (36).

Las ventajas del uso de vectores vivos en la generación de vacunas son la inducción de buenas respuestas celulares y que se evitan los problemas del procesamiento y purificación del antígeno inherentes a las vacunas de subunidades proteicas (34). Uno de los inconvenientes que tiene el empleo de vaccinia para este fin es su capacidad potencial de causar infecciones generalizadas en personas inmunodeprimidas, lo cual ha sido mejorado con el uso de virus vaccinia atenuado y con la introducción de vectores más aceptables como los poxvirus que tienen

un rango hospedero limitado cuya replicación es abortiva en especies no aviares (37); esto ha hecho que se haya continuado trabajando con estos vectores para el desarrollo de vacunas contra Dengue como el virus vaccinia Ankara, altamente atenuado para expresar el 80% de las proteínas E de Dengue 2 y 4, el recombinante que expresaba la proteína de Dengue 4 no indujo respuesta de anticuerpos neutralizantes en ratones, mientras que sí fue inducida con el que expresaba la de Dengue 2, este último recombinante fue capaz de inducir respuesta protectora en monos que fueron sometidos a un reto letal (38).

Vacunas de subunidades

El camino de las vacunas de subunidades proteicas también ha sido explorado para la expresión de proteínas recombinantes para lo cual se han utilizado tanto vectores procariotas como eucariotas (34).

Srivastava y col., en 1995 (39) expresaron en *Escherichia coli* un segmento de la proteínas E y NS1 de Dengue 2, fusionado con la proteína A de *Staphylococcus aureus*, los ratones inmunizados con esta proteína de fusión purificada desarrollaron anticuerpos neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación contra Dengue 2 y fueron protegidos en un reto letal contra dicho virus. La expresión de antígenos proteicos en vectores procariotas es relativamente barata, pero tiene como desventajas que no se glicosilan, la estructura terciaria de las proteínas puede no mantenerse durante la purificación y la respuesta inmune inducida por ellos es pobre (14).

Sariol y col. en 1998 (40), utilizaron la levadura *Pichia pastoris* para expresar la proteína E de Dengue 4 truncada en el aa 53 de su carboxilo terminal, dicha proteína purificada tanto por cromatografía de inmunoafinidad como por cromatografía de adsorción de iones metálicos inmovilizados produjo anticuerpos neutralizantes e inhibidores de hemaglutinación (41). Con el uso de este vector eucariota se puede lograr la glicosilación de la proteína a expresar, así como una correcta estructura terciaria (14).

La utilización de baculovirus como vector de expresión para la producción de antígenos de subunidades proteicas ha permitido producir grandes cantidades de antígeno y un correcto procesamiento de las glicoproteínas, sin embargo estos antígenos necesitan ser purificados y pueden no generar una buena respuesta celular (34).

Ratones inmunizados con un fragmento de la proteína E de Dengue 1 expresada en baculovirus produjeron

anticuerpos neutralizantes contra Dengue 1 y fueron protegidos en un reto letal contra dicho virus (42).

La inmunización de ratones con la proteína E completa de Dengue 2 expresada en baculovirus, no indujo la producción de anticuerpos neutralizantes contra dicho serotipo y fueron parcialmente protegidos contra un reto letal con el mismo (43).

Proteínas E de Dengue 2 y 3 truncadas en su carboxilo terminal fueron expresadas en baculovirus. El suero de ratones inoculados con cada una de ellas mostró anticuerpos neutralizantes contra el serotipo homólogo, mientras que la inmunización con una preparación bivalente incluyendo ambas proteínas los indujo contra ambos serotipos. Ante un reto con Dengue 2, la proteína recombinante del serotipo homólogo indujo una protección del 90% y la del heterólogo una protección cruzada del 54%, por su parte la preparación bivalente indujo protección en el 80% de los ratones inoculados (44).

Staropoli y col., en 1997 (45) también reportaron la producción de anticuerpos neutralizantes e inmunidad protectora en ratones inmunizados con proteína E de Dengue 2 expresada en baculovirus y truncada en su carboxilo terminal.

Kelly y col., en el 2000 (46) inmunizaron ratones adultos con agregados multiméricos de una Proteína E completa de Dengue 2 expresada en baculovirus y obtuvieron altos títulos de anticuerpos neutralizantes.

Una vacuna de subunidades proteicas conteniendo el dominio B de la proteína E de los 4 serotipos fusionado a la proteína maltosa de *E. Coli* se evaluó individualmente y de forma tetravalente en ratones. El suero de los animales inmunizados con el candidato monovalente desarrolló altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra el serotipo homólogo. De igual forma el suero de los ratones inmunizados con el candidato tetravalente neutralizó los 4 serotipos de dengue en el ensayo de neutralización por reducción de placas (47).

Otro candidato se desarrolló a partir de partículas subvirales extracelulares de dengue 2 producidas por una línea celular de mamíferos establemente transfectada. La inmunización de ratones Balb/c con estas partículas subvirales indujo niveles adecuados de anticuerpos neutralizantes (48).

Vázquez y col. en 2002 (49), evaluaron la actividad inmunológica de cinco péptidos sintéticos que contenían epitopes para células B de la proteína prM de Dengue 2 en ratones BALB/c. Dos péptidos indujeron anticuerpos neutralizantes contra los 4 serotipos de

Dengue. Cuatro de los mismos indujeron respuestas proliferativas virus específicas sugiriendo la presencia de epitopes para células T y la inmunización de ratones con tres de ellos provocó niveles significativos de protección ante un reto con Dengue 2. Este resultado es importante para establecer la importancia de antígenos prM y M en el desarrollo de vacunas contra Dengue.

Virus atenuados por ingeniería genética y clones infecciosos de ADN

Una tecnología de gran potencial para la obtención de vacunas contra Dengue es el desarrollo de virus atenuados por ingeniería genética y de clones infecciosos de ADN. Esta permite determinar qué nucleótidos son los responsables de la atenuación de cepas salvajes, desarrollar lotes de vacunas atenuadas con alta estabilidad genética, constituye una alternativa para la obtención de vacunas de virus atenuados por la vía clásica y alterar o reemplazar genes virales para lograr candidatos vacunales no patogénicos y altamente inmunogénicos (34).

Se han construido quimeras intertípicas Dengue 4/Dengue1 y Dengue 4/Dengue 2, usando un clon infeccioso de cADN de Dengue 4; la primera de ellas es antigénicamente específica para Dengue 1 y la segunda para Dengue 2; las mismas se utilizaron para inmunizar monos rhesus y se obtuvo que los inmunizados con Dengue 4/Dengue 1 produjeron anticuerpos neutralizantes contra Dengue 1 y hubo protección ante un reto letal con dicho serotipo. Resultados similares a los anteriores se obtuvieron en el caso de la quimera Dengue 4/Dengue 2 y al inmunizar dichos monos con una mezcla de ambas quimeras se produjeron anticuerpos neutralizantes y protección contra ambos serotipos, lo que sugirió que estas quimeras pudieran ser empleadas en una vacuna tetravalente (50).

Un virus quimérico Dengue 2/Dengue 1 ha sido construido utilizando para ello los genes que codifican para las proteínas no estructurales de la cepa PDK 53 de Dengue 2 y los que codifican para las estructurales de la cepa 16007 de Dengue 1. Esta quimera indujo en ratón, mayores títulos de anticuerpos neutralizantes contra Dengue 1 que la cepa atenuada PDK 13 derivada de la 16007. Esta quimera puede ser un potencial candidato vacunal para Dengue 1. Con este estudio sus autores sugieren que los clones infecciosos derivados de la cepa PDK 53 pueden ser vectores atenuados prometedores para el desarrollo de vacunas quiméricas de flavivirus (51).

Un virus quimérico fue construido utilizando el cADN infeccioso de Fiebre Amarilla al cual se le insertaron los

genes que codifican para las proteínas prM y E de Dengue 2. La inmunización de monos rhesus con este virus indujo una leve viremia que no se produjo ante un reto con virus dengue 2 salvaje, y fue inducida producción de anticuerpos neutralizantes e inmunidad protectora ante un posterior reto (52), además la inmunización de ratones Balb/c con este candidato indujo una respuesta específica de células T CD8⁺ contra las proteínas prM y E de dengue 2, la cual protegió dichos ratones contra una encefalitis letal por dengue (53). Esta quimera presentó una reducción de la replicación, en mosquitos *A aegyptis* y *Aedes albopictus* similar a la descrita para la cepa vacunal 17D de Fiebre amarilla (54). Recientemente Guirakhoo y col. en 2002 (55), sometieron un candidato vacunal tetravalente Fiebre amarilla-Dengue a reconstrucciones genéticas y reformularon el contenido de la quimera de Fiebre amarilla-Dengue 2 en la mezcla tetravalente. La inmunización de monos con candidatos monovalentes y tetravalente indujo altos niveles de anticuerpos neutralizantes tanto contra las quimeras homólogas como heterólogas en una primera dosis. La administración de una segunda dosis del candidato vacunal tetravalente aumentó los títulos de anticuerpos tanto a las quimeras homólogas como heterólogas. El reajuste de la dosis contra la quimera Fiebre amarilla-Dengue 2 resultó en una respuesta más balanceada contra las quimeras Fiebre amarilla-Dengue1, 2 y 3, pero resultó mayor para Fiebre amarilla-Dengue 4, lo que sugiere la necesidad de hacer nuevos ajustes que deberán ser probados en monos para poder definir la formulación óptima que será probada en humanos.

Otro virus quimérico Fiebre amarilla /Dengue fue construido reemplazando los genes de fiebre amarilla que codifican para las proteínas prM y E por los de Dengue 2, la inmunización de ratones con este candidato indujo respuesta de anticuerpos neutralizantes y protección parcial contra un reto letal por dengue 2 (56).

Se obtuvo un candidato vacunal contra Dengue 4 por delección de 30 nucleótidos en la región NTR del genoma viral (57). Se realizó un ensayo clínico en 20 voluntarios para evaluar la inmunogenicidad y reactogenicidad al vacunar con una dosis única de dicho candidato, obteniéndose que fue bien tolerado y no causó enfermedad sistémica en ninguno de los voluntarios; sólo 10 de ellos desarrollaron un rash macular ligero y cinco una ligera elevación en el suero de los niveles de alanina aminotransferasa. Todos seroconvirtieron con títulos de anticuerpos neutralizantes mayores de siete veces en el día 28 y 14 de ellos manifestaron viremia (58). Recientemente

estos autores construyeron por esta vía de mutación, un candidato vacunal contra dengue 1, el cual resultó ser inmunogénico y estar altamente atenuado al ser evaluado en monos rhesus (59).

Esta línea de obtención de mutantes de delección en la zona 3 no codificante del genoma de Dengue ha sido descrita por otros autores, los que han logrado mutantes de virus dengue 1 y 2 con un rango restringido de hospedero (60).

Generación de estructuras semejantes a viriones

La generación de estructuras particuladas semejantes a viriones también ha sido empleada para obtener un candidato vacunal contra Dengue. Se han obtenido estructuras esféricas con un diámetro de 30 nm y morfología semejante a la de Dengue, en las que se comprobó la existencia de proteína E al utilizar anticuerpos monoclonales en una inmunomicroscopia electrónica; dichas estructuras se obtuvieron al coexpresar las proteínas estructurales de Dengue 1 en *Pichia pastoris* y fueron capaces de inducir anticuerpos neutralizantes al emplearlas en la inmunización de conejos (61).

Vacunas de ADN

Las vacunas de ADN han acaparado el interés de muchos investigadores involucrados en el desarrollo de vacunas contra Dengue (62). Estas vacunas brindan la posibilidad de que las proteínas virales sean procesadas dentro de las células hospederas, facilitan la formación de epitopes conformacionales y se estimula la respuesta celular citotóxica, sin embargo, tiene como desventajas la posibilidad de que el ADN se integre al genoma celular, la generación de enfermedades autoinmunes y que se induzca una tolerancia inmunológica (63).

El primer reporte de este tipo de vacuna para Dengue fue realizado por Kochel y col. en 1997 (64), ellos clonaron la proteína prM y 92% de la E de Dengue 2 en plásmidos de expresión eucariotas con los que inmunizaron ratones en los cuales se indujo la producción de anticuerpos neutralizantes. Un año después Porter y col. (65) incorporaron un motivo cpG del ADN inmunestimulador a la construcción anterior e inmunizaron ratones que fueron sometidos a un reto letal y lograron protección en los mismos.

Protección en macacos rhesus se logró al inocular los mismos por la vía intramuscular con un candidato vacunal de ADN que expresaba las proteínas prM y E de Dengue 1 (66). Resultados similares se obtuvieron al inocular monos *Aotus nancymae* con una construcción de Dengue 1 similar a la anterior, estos

monos produjeron anticuerpos neutralizantes y fueron protegidos contra un reto letal con Dengue 1 (67).

En los últimos años se ha logrado un mayor conocimiento de la enfermedad y su etiopatogenia así como de los aspectos necesarios para lograr una vacuna que brinde protección efectiva y duradera para el virus (10). Sin embargo, la prevención de la FD y FHD dependen en gran medida del esclarecimiento de la patogénesis de la enfermedad, de la respuesta inmune natural a la infección y de la posible diversidad genética del genoma viral por lo que el desarrollo de vacunas potentes y seguras, sobre todo para las poblaciones que viven en áreas endémicas, continúa siendo un reto para los años venideros (68).

Referencias

1. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microb Rev.* 1990; 3(4):376-396.
2. Pancharoen C, Kulwichit W, Tantawichien T, Thisyakorn U, Thisyakorn C. Dengue infection: a global concern. *J Med Assoc Thai.* 2002; 85:25-7.
3. Kourí GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue Hemorrhagic Fever/ Dengue Shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull WHO.* 1989; 67: 375- 380.
4. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V y cols. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiological study in Rayong, Thailand I: the 1980 outbreak. *Am J Epidemiol.* 1984; 120:653-669.
5. Halstead SB. Pathogenesis of Dengue: challenge to Molecular Biology. *Science.* 1988; 239:476-481.
6. Kurane I, Rothman AI, Livingston PE, Green S, Gagnon SJ, Janus J, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Ennis FA. Immunopathologic mechanisms of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *Arch Virol.* 1994; Suppl 9:59-64.
7. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 1997; 230:244-251.
8. Gubler DJ, Clark GC. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Inf Dis.* 1995; 1(2):55-57.
9. Rigau-Pérez J, Clark G, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1998; 352:971-977.
10. Guzmán MG. Avances para la obtención de una vacuna contra el dengue. *Acta Científica Venezolana.* 1998; 49(Supl 1):38-45.
11. Brandt WE. Current approaches to the development of Dengue vaccines and related aspects of the molecular biology of flaviviruses. *J Inf Dis.* 1988; 157(5):1105-1111-126.

12. Barret AD. Current status of flavivirus vaccines. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 951:262-271.
13. Innis, BL. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. En: *Exotic Infections.* Porterfield. Chapman and Hall London. 1995:103-146.
14. Bielefeldt - Ohmann H. Obstacle to the development of Dengue virus vaccines: enhancement of disease by neutralizing antiviral antibodies and virus evolution? *Vaccine Res.* 1997; 6(3):113
15. Sabin AB. Recent advances in our knowledge of Dengue and Sandfly fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1955; 4:198: 207.
16. Schlesinger RW, Gordon I, Frankiel JM, Winter JM, Patterson PR, Dorrance WE. Clinical and serological responses of man to immunization with attenuated Dengue and Yellow Fever virus. *J Immunol.* 1956; 77: 352- 364.
17. Wisseman CL, Sweet BH, Rosenzweig EC, Eylar OR. Attenuated living type 1 Dengue vaccines. *Am J Trop Med Hyg.* 1963; 12:620:623.
18. Sabin AB, Schlesinger RW. Production of immunity to Dengue virus with virus modified by propagation in mice. *Science.* 1945; 101:640- 642.
19. Eckels KH, Harrison VR, Summers PL, Russell PK. Dengue 2 vaccine: Preparation from a small virus clone. *Inf Immun.* 1980; 27:175-180.
20. Halstead SB, Diwan AR, Marchette NJ, Palumbo NE, Srisukonth L. Selection of an attenuated Dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. I. Attributes of uncloned virus at different passages levels. *Am J Trop Med Hyg.* 1984; 33 (4):654-655.
21. Bancroft WH, Top FH, Eckels KH, Anderson JH Jr., Mc Cown JM, Rusell PK. Dengue - 2 vaccine: virological, immunological, and clinical responses of six Yellow fever immune recipients. *Inf Immun.* 1981; 31:678-703.
22. Bancroft WH, Scott R McN, Eckels KH, Hoke JH Jr., Simms TE, Jesrani KD, Summers PL, Dubois DR, Tsoulos D, Rusell PK. Dengue type 2 vaccine: reactogenicity and immunogenicity in soldiers. *J Infect Dis.* 1984; 149:1005- 1010.
23. Eckels KH, Scott R McN, Bancroft WH, Brown J, Dubois DR, Summers PL, Rusell PK, Halstead SB. Selection of an attenuated Dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. V. Human response to immunization with a candidate vaccine prepared in foetal rhesus lung cells. *Am J Trop Med Hyg.* 1984; 33(4):684- 689.
24. Mckee KT Jr, Bancroft WH, Eckels KH, Redfield RR, Summers PL, Rusell PK. Lack of attenuation of a candidate dengue 1 vaccine (45 AZ5) in human volunteers. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36(2):435- 442.
25. Innis BL, Eckels KH, Kraiselburd E, Dubois DR, Meadors GF, Gubler DJ, Burke DS, Bancroft WH. Virulence of a live vaccine candidate: a possible new marker of Dengue virus attenuation. *J Infect Dis.* 1988; 158:876-880.
26. Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Vaughn DW, Eckels KH, Dubois DR, Summers PL, Hoke CH. A live attenuated Dengue - 1 vaccine candidate (45 AZ5) passaged in Primary Kidney Dog Cell Culture is attenuated and immunogenic for humans. *J Infect Dis.* 1994; 170:1448-1455.
27. Marchette NJ, Dubois DR, Larsen LK, Summers PL, Kraiselburd EG, Gubler DJ, Eckels KH. Preparation of an attenuated Dengue 4 (341750) virus vaccine. I. Preclinical studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;43 (2): 219-226.
28. Hoke cH, Malinoski FJ, Eckels KHH, Scott RM, Dubois DR, Summer PL, Simms Tt, Burrous J, Hastly SE, Bancroft WH. Preparation of an attenuated dengue 4 (341750 Carib) virus vaccine. II Safety and immunogenicity in humans. *AM J Trop Med Hyg.* 1990; 43(2):219-226.
29. Bhamarapravati, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine.* 2000; 18(Supp 2):44-47.
30. Alvarez M, Guzmán MG, Pupo M, Morier L, Bravo J and Rodriguez R. Study of biologic attributes of cuban dengue 2 virus after serial pasaje in primary dog kidney cells. *Int J Infect Dis.* 2001; 5(1):35-39.
31. Ada G, Ramsay A. Traditional - type human vaccines and vaccination practices. En: *Vaccine*, vaccination and the immune response. Filadelfia, New York: Lippincott - Raven Publishers. 1996:12-36.
32. Putnak R, Cassidy K, Conforti N, Lee R, Sollazo D, Troung T, Ing E, Dubois D, Sparkuhl J, Gastle W, Hoke C. Immunogenic and protective immune response in mice immunized with a purified, inactivated, dengue 2 virus vaccine prototype made in fetal rhesus lung cells. 1996; 55(5):504-510.
33. Putnak R, Barvir DA, Burruous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH, Sadoff JC, Eckels KH. Development of a purified, inactivated , Dengue 2 virus vaccine prototype in Vero cells: Immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis.* 1996b; 174(6):1176- 184.
34. Putnak R. Progress in the development of recombinant vaccines against Dengue and other Arthropod borne flavivirus. En: *Modern Vaccinology.* Kurstak E (eds.). New York: *Plenum Medical.* 1994: 231-252.
35. Bray M, Zhao B, Markoff L, Eckels KH, Chanock RM, Lai CJ. Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without non structural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis. *J. Virol.* 1989; 63:2853- 2856.
36. Fonseca BAL, Pincus S, Shope RE, Paoletti E, Mason PW. Recombinant vaccinia virus co-expressing dengue 1

- glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 1994;12(3):279-285.
37. Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:11341-11348.
 38. Men R, Wyatt L, Tokimatsu I, Arakaki S, Shameen G, Elkins R, Chanok R, Moss B, Lai C. Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induce resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine*. 2000; 18(27):3113-3122.
 39. Srivastava AK, Putnak JR, Warren RL, Hoke CH Jr. Mice immunization with a Dengue type 2 virus E and NS₁ fusion protein made in *Escherichia coli* are protected against lethal Dengue virus infection. *Vaccine*. 1995; 13(3):1251-1258.
 40. Sariol C, Mune M, y col. Process for the expression of genes of the dengue viruses. Publication date 1998 06 04. Request patent W 0823754A 19980604.
 41. Hermida L, Rodríguez R, Lazo L, López C, Márquez C, Páez R y col. A recombinant envelope protein from dengue virus purified by ICAM is bioequivalent with it's immune-affinity chromatography purified counterpart. *J Biotechnol*. 2002; 94(2):213-216.
 42. Putnak R, Feigny R, Burruous J, et al. Dengue - 1 virus envelop glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicits virus - neutralizing antibody in mice and protects them from virus challenge. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 45 (2):159- 167.
 43. Feigny R, Burruous J, Putnak R. Dengue type 2 envelop protein made using recombinant baculovirus protects mice and against virus challenge. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 50(3):322-328.
 44. Delenda CH, Staropoli I, Frankiel MP, Cabanié L, Deubel V. Analysis of c-terminally truncated dengue2 and dengue3 virus envelope glycoproteins: processing in insect cells and immunogenic properties in mice. *J Gen Virol*. 1994; 75:1569-1578.
 45. Staropoli I, Frenkiel-MP, Mégret F, Deubel V. Affinity purified dengue 2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. *Vaccine*. 1997; 15(17/18):1946-1954.
 46. Kelly EP, Greene JJ, King AD, Innis BL. Purified dengue2 virus envelope glycoprotein aggregates produced by baculovirus are immunogenic in mice. *Vaccine*. 2000; 18(23):2549-2559.
 47. Simmons M, Murphy GS, Hayes CG. Antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. *AM J Trop Med Hyg*. 2001;65(159-161).
 48. Konishi E, Fujai A. Dengue type 2 virus subirla extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. *Vaccine*. 2002; 15(7-8):1058-1067.
 49. Vázquez S, Guzmán MG, Guillén G, Chinea G, Pérez AB, Pupo M y col. Immune response to syntetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine*. 2002; 20(13):1823-1830.
 50. Bray M, Men R, Lai CJ. Mice immunize with intertypic chimeric dengue viruses are protected against wild type virus challenge. *J Virol*. 1996; 70(4):4162- 4166.
 51. Huang CY, Butrapet S, Pierro DJ, Chang GJ, Hun AR, Bhamarapravati N, Gubler DJ, Kinney RM. Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK 53)/dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine. *J Virol*. 2000; 74(7):3020-3028.
 52. Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers TJ, Zhanq ZX, Soike K, Ratterree M y cols. *J Virol*. 2000; 74(12):5477-5485.
 53. Van der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R y Strauss JH. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8+ T- cell response. *J Virol*. 2000; 74(17):8094-8101.
 54. Johnson BW, Chambers TV, Crabtree MB, Bhatt TR, Guirakhoo F y cols. Growth characteristics of Chimerivax-Den2 vaccine virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67(3):260-265.
 55. Guirakhoo F, Pugachev K, Arroyo J, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R y col. Viremia and immunogenicity in non human primates of a tetravalent yellow fever- dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. *Virology*; 2002; 298(1):146-159.
 56. Caufour PS, Motta MC, Yamamura AM, Vazquez S, Ferreira II, Jabor AV y cols. Construction, characterization and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D- dengue type 2 viruses. *Virus Res*. 2001; 79(1-2):1-14.
 57. Troyer JM, Hanley KA, Whitehead SS, Strickman D, Karron RA, Durbin AP y cols. A live attenuated recombinant dengue 4 virus vaccine candidate with restricted capacity for dissemination in mosquitoes and lack of transmission from vaccines to mosquitoes. *Am J Trop med Hyg*. 2001; 65(5):414-419.
 58. Durbin AP, Karron RA, Sun W, Vaughn DW, Reynolds MJ, Perrault JR y cols. Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type 4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in it's 3'- untranslated region. *AM J Trop Med Hyg*. 2001;65(5):405-413.
 59. Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney Jr JE, Markoff L, Murphy BR. A live attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the untranslated region is highly attenuated and

- immunogenic in monkeys. *J Virol.* 2003; 77(2):1653-1657.
60. Markoff L, Pang X, Hough HS, Falgout B, Olsen R, Jones E y cols. Derivation and characterization of a dengue type1 host range restricted mutant virus that is attenuated and highly immunogenic in monkeys. *J Virol.* 2002; 76(7):3318-3328.
61. Surgrue R, Fu J, Howe J, Chan Y-Ch. Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus like particles. *J Gen Virol.* 1997; 78:1861-1866.
62. Chang GJ, DavisBS, Hunt AR, HolmesDA, Kuno G. Flavivirus DNA vaccines: Current status and potential. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 951:272-278.
63. Gupta RK. New advances in vaccine technologies and applications. *Vaccine.* 1995;13(16):1623-1625.
64. Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart PP, Hoffman S, Porter KR, Hayes CG. Inoculation of plasmids expressing the dengue 2 envelope protein elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine.* 1997; 15(5):547-552.
65. Porter KR, Kochel TJ, Wu SJ, Raviprakash K, Phillips I, Hayes CG. Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immunostimulatory motifs on antibody responses. *Arch Virol.* 1998; 143(5):997-1003.
66. Raviprakash K, Porter KR, Kochel TJ, Ewing D, Simmons M, Phillips I, , Weiss WR, Hayes CG. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in rhesus macaques. *J Gen Virol.* 2000; 81(Pt 7):1659-1667.
67. Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, Watts DM, Russell KL, Gozalo AS, Phillips I, Ewing DF, Murphy GS, Porter KR. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine.* 2000; 18(27): 3166-3177.
68. Baize Sylvain, Marianneau Ph, Georges-Courbot M-C, Deubel V. Recent advances in vaccines against viral haemorrhagic fevers. *Opin Infect Dis.* 2001;14:513-518.

Vaccines against dengue virus: History

Abstract

Dengue Fever (DF) and Dengue Haemorrhagic Fever (DHF) have emerged as the most important human viral diseases transmitted by arthropod vectors. The characteristics of this disease, plus the absence of effective antiviral drugs, the increase in the number of cases, affected countries and the difficulties for vector control have made the development of dengue vaccines a public health priority. Since the middle of the past century many strategies have been explored to achieve this objective. In spite of the advances in this field, there is much research to be done in order to have available an immunogen against dengue.

Keywords: dengue, vaccine