

Estado actual de las vacunas contra el Dengue. Perspectivas

Betzana M. Zambrano-Mora

Investigación y Desarrollo, Sanofi Pasteur Latinoamérica, Montevideo, Uruguay

RESUMEN

El dengue continúa extendiéndose más allá de las regiones tropicales y subtropicales y se ha convertido en un problema creciente de Salud Pública en las áreas endémicas, con un aumento importante en la incidencia y en la mortalidad. Las medidas de control no han logrado ser suficientes, y no se dispone de medidas específicas de tratamiento y prevención. En las últimas décadas se han hecho avances en el diseño de vacunas contra el dengue, con tecnologías innovadoras. La mayoría de estas vacunas se encuentra en etapas pre-clínicas del desarrollo y sólo algunas han alcanzado las fases clínicas, con resultados prometedores. Se espera poder contar en un futuro cercano con una vacuna contra el dengue, que complemente las estrategias existentes de control de esta enfermedad. Esta es una revisión del estado actual de las vacunas en desarrollo. Además, se incluye información sobre los lineamientos que la OMS ha coordinado para la realización de ensayos clínicos y aspectos regulatorios a considerar para el registro futuro de estas vacunas contra el dengue.

Palabras clave: Dengue, Dengue virus, Flavivirus, Vacunas, Vacunación

ABSTRACT

Current status of Dengue Vaccines. Perspectives

Dengue fever continues spreading beyond tropical and sub-tropical regions and it became an increasing Public Health issue in endemic areas, with an

important growing in its incidence and mortality. Control measures have not been enough and specific means of treatment and prevention are still not available. Advances in dengue vaccines design through innovative technologies have been made in the last decades. Most of these vaccines are in pre-clinical stages of development and only some of them have reached clinical stages, with promising results. It is expected to have available a dengue vaccine in the near future, that may complement the existing strategies of control disease. This is a review on the current status of vaccines in development. Besides, it is included some information on guidelines coordinated by the WHO to conduct clinical trials, and regulatory aspects to be considered for the future license of these dengue vaccines.

Key words: Dengue, Dengue virus, Flavivirus, Vaccines, Vaccination

INTRODUCCIÓN

El virus del dengue es uno de los más importantes patógenos arbovirales que afectan las regiones tropicales y subtropicales. Se estima que anualmente ocurren más de 50 millones de infecciones, 500.000 hospitalizaciones, y 20.000 muertes por dengue (1). Más de 100 países han experimentado brotes de fiebre por dengue o Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD). En la región de las Américas actualmente están circulando los 4 serotipos del virus y en 2009, 26 países notificaron

Solicitud de sobretiros: Dra. Betzana M. Zambrano-Mora. Investigación y Desarrollo sanofi pasteur Latinoamérica, Ellauri 938 Esq. Lamas, Montevideo 11300 Uruguay. E-mail: betzana.zambrano@sanofipasteur.com, betzana@gmail.com

Recibido: el 8 de agosto de 2010. **Aceptado para publicación:** el 20 de octubre de 2010

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb102137.pdf>

Zambrano-Mora

casos de fiebre hemorrágica por dengue a la Organización Panamericana de la Salud (OPS). En las últimas 3 décadas, Brasil es el país de la región que ha notificado más casos de fiebre por dengue (más del 55% de los casos), sin embargo, Venezuela y Colombia son los países que han notificado más casos de fiebre hemorrágica por dengue en el mismo período (entre ambos, más del 67% de los casos) (2). El 7 de julio de 2010, la OPS publicó un alerta epidemiológica de dengue en la región, ya que hasta la semana 26 se habían notificado 1.009.756 casos, 21.213 de ellos diagnosticados como dengue grave y 503 muertes. Estas cifras de casos totales indudablemente superarán las del 2002, año de la presente década en que más casos de dengue habían sido notificados. (3,4). El dengue se ha convertido en un problema creciente de salud pública en países endémicos y continúa extendiéndose más allá de las regiones tropicales y subtropicales.

La infección por dengue es producida por cualquiera de los cuatro serotipos antigénicamente distintos: el dengue 1, 2, 3 y 4 (DENV-1, DENV-2, DENV-3 Y DENV-4). Al igual que el virus de la fiebre amarilla, los virus del dengue son transmitidos al hombre por el mismo vector, el mosquito del género *Aedes*. Aunque existen más de 5.000 especies de *Aedes*, el vector que está asociado mayoritariamente a la transmisión del dengue es el *Aedes aegypti* y es el responsable de las grandes epidemias en las Américas. El *Aedes albopictus* está presente en varios de los países de la región (EEUU, Argentina, Brasil, México, República Dominicana, Venezuela, Uruguay, entre otros) y está más relacionado con la transmisión del dengue en otros continentes. El virus del dengue puede ser transmitido por estos vectores y replicarse en primates no humanos (monos, chimpancés), sin embargo éstos, a diferencias del humano, no manifiestan formas clínicas de la infección. Para el desarrollo de vacunas esto representa un desafío, ya que aunque hay especies que pueden desarrollar la infección por virus del dengue, no la evidencian clínicamente. Es por

ello que al no contar con correlatos de protección en animales, la evaluación de la eficacia de vacunas contra del dengue requerirá de ensayos de eficacia en humanos, en áreas endémicas de la enfermedad.

La presente revisión incluye las características del virus, una breve historia sobre el desarrollo de las vacunas contra el dengue, el estado actual de estas vacunas, algunos desafíos que aún quedan por enfrentar y las guías generadas en coordinación con la Organización Mundial de la Salud no sólo para la realización de ensayos clínicos en países endémicos de dengue, sino las primeras pautas orientadoras para las agencias regulatorias nacionales, para el registro de vacunas tetravalentes vivas atenuadas contra el dengue, que son las que se encuentran en etapas más avanzadas del desarrollo.

El virus del dengue

Es fundamental conocer las características del virus para entender el camino que han seguido las investigaciones para el desarrollo de vacunas contra el dengue. La **Figura 1** esquematiza el genoma del virus del dengue, el cual es una partícula esférica de alrededor de 40 a 50nm de diámetro, conformado por 3 proteínas estructurales (cápside, envoltura y de membrana) y 7 no estructurales (NS). Posee una envoltura de la que surgen unas finas proyecciones hacia la superficie que constituyen las proteínas estructurales de envoltura (E) y de membrana (M). El material genético está contenido dentro de una nucleocápside (C) poliédrica de aprox. 25-30nm de diámetro. Entre la envoltura y la nucleocápside existe una bicapa lipídica, cuyos lípidos se piensa que provengan de la membrana de la célula huésped (5).

El genoma de ARN es una cadena lineal simple, y de polaridad positiva, de aproximadamente 11.000 pares de bases de longitud y codifica a 10 proteínas en un marco simple de lectura abierta, tres de ellas estructurales (Cápside, Envoltura y pre-Membrana) en extremo amino terminal (región no codificante 5') del genoma y siete no estructu-

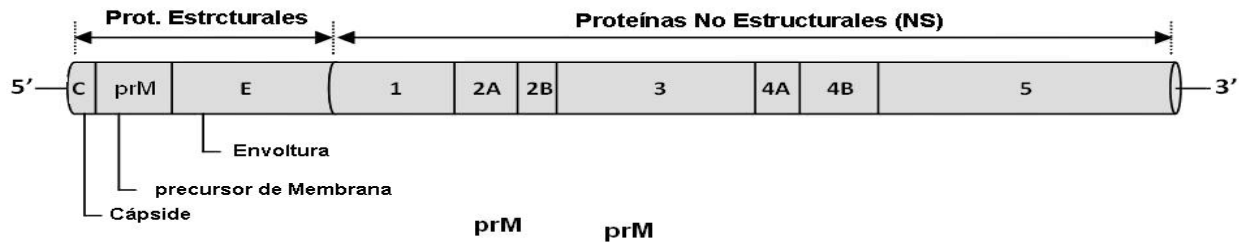


Figura 1. Representación esquemática del genoma del virus del Dengue

rales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) en el extremo carboxilo terminal (región no codificante 3') del genoma viral (**Fig.1**). El ARN viral funciona como ARN mensajero al traducirse directamente en los ribosomas durante el proceso de replicación. Los extremos 5' y 3' del genoma del virus contienen regiones no traducidas (*UTR*) que juegan un papel importante en la replicación. El extremo 5' es más corto que el 3', con un número menor de nucleótidos y estructura diferente.

Componentes del virus del Dengue y su capacidad para inducir respuesta inmunológica

Proteínas estructurales

Nucleocápside (C): La nucleocápside o proteína de la cápside (C) tiene forma icosaédrica, cubre y protege al material genético y está cargada positivamente, lo que parece neutralizar la carga negativa del ARN viral. Las proteínas de la cápside purificadas no han mostrado tener la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes.

Pre-Membrana (pre-M) y Membrana (M): La proteína pre-Membrana (pre-M) es el precursor glicosilado de la proteína de Membrana (M). Parece funcionar como chaperona para la proteína E durante el proceso de maduración viral, ayudándola a mantener su estructura y protegiéndola de las acciones de un medio con pH ácido, hasta que se complete el ensamblaje y el virión pueda salir de la célula invadida por medio de vesículas exocíticas. Durante la maduración viral, la proteína E puede ser expuesta en el aparato de Golgi a medio ácido,

lo que podría provocar cambios conformacionales irreversibles en dicha proteína con la subsiguiente inactivación viral. Los viriones maduros contienen en su superficie proteínas E (de Envoltura) y M y sólo los viriones maduros que contienen proteína M son infecciosos. La proteína pre-M es capaz de inducir respuesta de anticuerpos.

Proteína de Envoltura (E): La proteína E es una glicoproteína que existe en la forma de homodímeros. Estos homodímeros se agrupan de tres en tres, semejando una espiga, y se acomodan paralelamente a la superficie del virus, cubriéndolo totalmente, junto con las proteínas M (5, 6). Un monómero de proteína E está formado por 3 dominios estructurales: el DI (conocido anteriormente como Dominio antigénico C), DII (o Dominio A) y DIII (o Dominio B). El DI contiene la bisagra molecular de la glicoproteína. El DII contiene el péptido de fusión a la membrana celular y el DIII (tipo inmunoglobulina) tiene características de unión. La proteína E puede sufrir una reorganización irreversible, catalizada en pH ácido y volverse un homotrímero de fusión. Esta reorganización ocurre dentro del endosoma y permite la liberación de la nucleocápside viral al citoplasma de la célula huésped, con la correspondiente traducción del ARN viral e inicio de la síntesis proteica. Se ha descrito a la proteína E como el antígeno viral más importante, está asociada con la unión al receptor celular, a funciones de membrana virus-específicas que permiten iniciar el ciclo de replicación viral intracelular; también está asociada a la

Zambrano-Mora

hemaglutinación de eritrocitos y a la inducción de anticuerpos neutralizantes relacionados con la respuesta inmune protectora. Anticuerpos (Acs) que reconocen epítopes del DI han resultado ser no neutralizantes, en tanto que Acs contra el DII sí, probablemente por inhibición de péptido de fusión contenido en el DII, estos anticuerpos no son serotipo específicos. Epítopes del DIII ha mostrado ser capaces de provocar la formación de Acs neutralizantes serotipo específicos.

Proteínas No Estructurales (NS)

Se ha sugerido que las proteínas no estructurales (NS) están involucradas en el proceso de replicación viral. Es probable que la proteína NS1 tenga un rol en la maduración viral, ya que está asociada con la proteína E inmadura dentro del retículo endoplásmico. Las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B constituyen un grupo de proteínas estructurales pequeñas y su función no ha sido bien dilucidada. La NS3 puede estar involucrada en la regulación del ARN, se cree que sus funciones en la replicación viral son actuando como proteasa y helicasa. Se ha sugerido que en el dominio de la proteína NS5 reside la actividad ARN polimerasa dependiente de ARN para la replicación del ARN viral. De igual modo se ha descrito que las proteínas NS3 y NS5 tienen actividad enzimática de tipo replicasa (5). El conocimiento detallado de la estructura del virus ha sido de gran importancia para la búsqueda de un diseño adecuado de vacuna contra el dengue.

Vacunas contra el dengue: características esenciales

La falta de un modelo animal que desarrolle la enfermedad como el humano para evaluar la protección, la dificultad en lograr una respuesta balanceada de inmunogenicidad a los 4 serotipos y el correlato de protección aún no establecido, son algunos de los obstáculos al que se han enfrentado los investigadores de una vacuna contra el dengue. Para probar la adecuada protección de estas vacunas indudablemente serán necesarios ensayos fase

III de eficacia en regiones endémicas de dengue. Una vacuna contra el dengue debería tener idealmente las siguientes características:

- Contener los 4 serotipos del virus
- Tener un buen perfil de seguridad
- Respuesta balanceada de inmunogenicidad (para los 4 serotipos) y de reactogenicidad
- Esquema de inmunización corto (ej. 1 ó 2 dosis de vacuna a intervalos breves) que hiciera práctica su utilización, incluso para el control de brotes.
- Ofrecer una protección duradera
- Ser de fácil aplicación, transporte y almacenamiento
- Accesibilidad en costos para su implementación y sustentabilidad en calendarios nacionales de vacunación.

Además, dado que la enfermedad se ha visto que puede ser más severa en niños, la vacuna no debería producir interferencia inmunológica con otras vacunas en edades pediátricas, para facilitar su aplicación dentro de los calendarios de vacunación actuales.

En el caso de vacunas atenuadas, es importante que conserven una estabilidad genética en todas sus etapas de producción, que produzcan una viremia aceptable de replicación, útil para una adecuada respuesta inmunológica, pero limitada en su capacidad de replicación en el mosquito de manera de evitar la transmisión del virus vacunal por los mosquitos.

Historia de las vacunas contra el dengue

Por más de 70 años se ha intentado obtener una vacuna segura e inmunogénica contra el dengue. Los primeros esfuerzos en el desarrollo de vacunas contra el dengue comenzaron varios años antes de que se aislara al virus del dengue. Desde 1898 y durante todo el período de ocupación de las Filipinas por la armada estadounidense, el dengue era una causa importante de bajas por enfermedad y pérdidas económicas debidas a la hospitalización de sus fuerzas militares. Luego,

Vacunas contra el dengue en desarrollo

durante la segunda guerra mundial, las tropas japonesas y estadounidenses sufrieron los estragos del dengue en las selvas tropicales del sur del Pacífico, esto atrajo el interés en desarrollar vacunas que pudieran prevenir la enfermedad tanto en Asia como en EEUU. En la **Figura 2** se muestra un resumen de algunos hitos en la historia con relación al aislamiento y serotipificación del virus, así como también a los diferentes prospectos de vacunas que se han desarrollado. Las primeras tentativas documentadas de desarrollar vacunas inactivadas y atenuadas con bilis de buey fueron llevadas a cabo por el Director del Instituto Pasteur de Atenas de la época, Dr G Blanc y J. Caminopetros, durante una epidemia de dengue en Grecia en 1927 (7), pero estos preparados perdían su poder inmunizante 15min después de su preparación (8). En 1928-1930 Simmons, St John y Reynolds en EEUU intentaron vacunas inactivadas con suspensiones salinas de mosquitos

Aedes aegypti infectados, macerados y tratados con formalina y calor (9,10). Dichas vacunas resultaron inefectivas.

Aislamiento e identificación de los serotipos del dengue: A finales de la Segunda Guerra Mundial investigadores Japoneses y Norteamericanos casi al mismo tiempo hicieron aportes importantes en el descubrimiento del virus. Hotta y Kimura lograron aislarlo de especímenes recolectados de pacientes entre 1942 y 1945, luego se determinó que era el serotipo 1 (DENV-1) (10). Paralelamente, Sabin y Schlesinger aislaron el DENV-1 y DENV-2 de pacientes de Hawai y Nueva Guinea respectivamente (11). Usando múltiples pasajes por ratones lactantes, Sabin logró diseñar una vacuna viva atenuada contra el DENV-1, los trabajos con esta vacuna fueron continuados por Bellanti, Wisseman y colaboradores (12), quienes durante una epidemia de DENV-3 en Puerto Rico en 1963, en un estudio controlado, vacunaron a

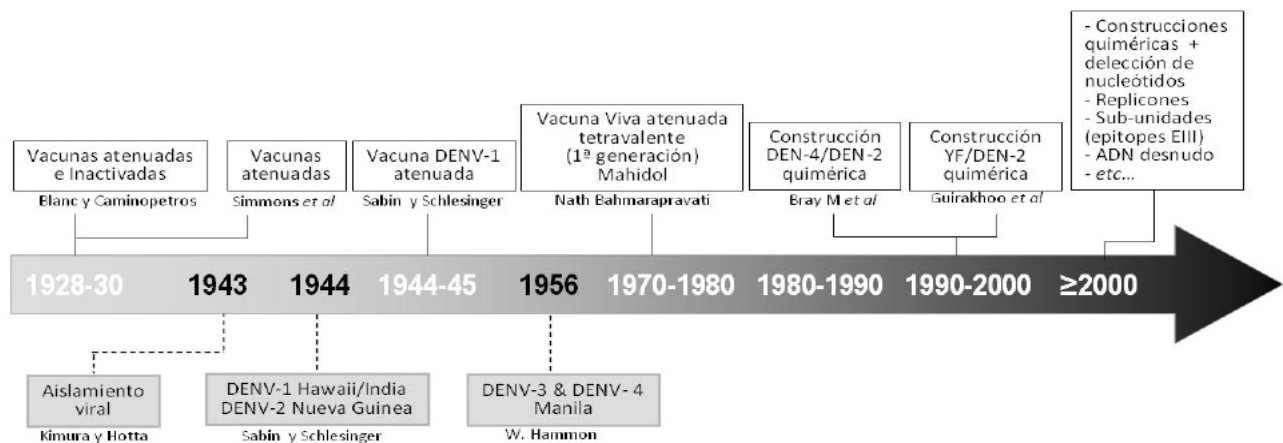


Figura 2. Eventos en el desarrollo de vacunas contra el dengue y el aislamiento viral. Las fechas son aproximadas La lista no es exhaustiva

Zambrano-Mora

adolescentes y adultos jóvenes varones, 561 de los cuales recibieron la vacuna atenuada y 552 el placebo (10,13). La vacuna fue bien tolerada, no causó reacciones sistémicas, indujo anticuerpos neutralizantes y disminuyó la incidencia de dengue en 39% de los vacunados en comparación con el grupo placebo. Sin embargo, debido al temor que existía sobre las complicaciones asociadas al uso de vacunas con derivados de tejidos murinos y el riesgo de contaminación con agentes adventicios, el desarrollo de estas vacunas fue abandonado (14). A pesar del abandono de estas vacunas, la contribución realizada al lograr pasajes del virus y su atenuación en células animales, fue muy importante en el desarrollo ulterior de vacunas atenuadas y el éxito en lograr la primera formulación de vacuna tetravalente contra el dengue probada en humanos. En 1971, se inició un programa científico a cargo de la Junta Epidemiológica de las fuerzas armadas de EEUU, con el objeto de desarrollar una vacuna viva atenuada tetravalente. La atenuación de los serotipos fue realizada por el Instituto de Investigación Walter Reed de la Armada de EEUU y de estos intentos se obtuvo un candidato DENV-2 con una cepa de Puerto Rico (PR-159-S1), la cual fue probada en estudios fase I en adultos. La vacuna fue inmunogénica en un poco más del 60% de los vacunados, fue ligeramente reactogénica y causó cuadros leves de la enfermedad en algunos casos. A finales de los años 70, la oficina regional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el sudeste de Asia, nombró al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Mahidol en Tailandia como el Laboratorio para el Desarrollo de la Vacuna viva atenuada tetravalente contra el Dengue, bajo la dirección del Profesor Nath Bhamarapravati. De estos esfuerzos que contaron con la asistencia técnica de diversas instituciones de Europa y América (la Fundación Rockefeller, el Instituto Walter Reed, la Universidad de Hawai, los gobiernos de Australia y de Italia, entre otros) surgió la primera generación de vacunas viva

atenuada tetravalente contra el dengue (15) que fue probada en estudios fase I y fase II en Asia, EEUU y Australia. Los serotipos DENV-1, 2 y 4 fueron atenuados por pasajes en células primarias de riñón de perro (PDK) y el DENV-3 en células de riñón de mono verde Africano (GMK) con pasajes adicionales por células de pulmón fetal de monos rhesus (FRhL), ya que este serotipo falló en replicar en las células de riñón de perro. Las formulaciones monovalentes y luego tetravalentes fueron probadas en adultos, y se realizaron ensayos fase II en niños. En 1993 la Universidad de Mahidol y la compañía farmacéutica francesa *Pasteur Mérieux sérums et vaccins* (ahora sanofi pasteur) firmaron un acuerdo para producir esta vacuna a gran escala. Sin embargo, en la formulación tetravalente, la respuesta preponderante era al DENV-3 y a pesar de que disminuyó la dosis de este serotipo en subsiguientes formulaciones, se decidió abandonar este desarrollo debido a la reactogenicidad del componente DENV-3. Los niños de áreas endémicas de dengue que habían participado en ensayos clínicos con esta vacuna fueron seguidos hasta por 8 años después de terminar su participación en el estudio y no se observó un aumento en el riesgo de desarrollar enfermedad severa durante todo el período de seguimiento (16,17). Más recientemente, el Instituto de Investigación Walter Reed de la Armada de los EEUU (WRAIR) y GlaxoSmithKline también habían desarrollado una vacuna tetravalente viva atenuada mediante pasajes seriados en células PDK y pasajes adicionales células FRhL. Se realizaron ensayos clínicos fase II con esta vacuna. Al igual que la vacuna de la Universidad de Mahidol, el desarrollo de esta vacuna viva atenuada también fue suspendido (18).

Estado actual del desarrollo de las vacunas contra el dengue

De un modo general, los esfuerzos actuales que se han hecho en investigación en vacunas contra el dengue se han enfocado principalmente en los modelos de vacunas vivas atenuadas, inactivadas

Vacunas contra el dengue en desarrollo

y a sub-unidades. Las vacunas vivas atenuadas han enfrentado diversos cuestionamientos por el hecho de que la enfermedad natural en una segunda infección podría causar cuadros clínicos más severos (dengue hemorrágico, síndrome del shock por dengue). Si bien la patogenia de la enfermedad aún no ha logrado ser dilucidada y pareciera que la etiología del dengue hemorrágico es debida a factores multifactoriales *in vivo*, una de las teorías que ha intentado explicar *in vitro* el mecanismo de los cuadros severos posteriores a infecciones secundarias es el de la amplificación de la infección dependiente de anticuerpos (ADE, *Antibody Dependent Enhancement*). Los anticuerpos neutralizantes producidos por una infección anterior resultan protectores en una nueva infección, sin embargo, la existencia de anticuerpos heterólogos no neutralizantes, en lugar de ser protectores, aumentarían la infección de células mediante su unión al virus (anticuerpos facilitadores de la infección). Este complejo virus-anticuerpo se uniría entonces a receptores Fc presentes en la superficie de células blanco y desencadenar la cascada de eventos inflamatorios y manifestaciones clínicas severas. En un estudio en Brasil la infección secundaria no resultó ser un factor predictivo de dengue severo en adultos (19,20). Las vacunas vivas atenuadas deberían producir anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos del dengue, razón por la cual las vacunas deberían ser tetravalentes.

La proteína E ha sido la más utilizada como antígeno objetivo para la estimulación de respuesta inmunológica tanto en vacunas vivas atenuadas como en vacunas a subunidades contra el dengue. También se han llegado a considerar como agentes inmunizantes candidatos para una vacuna a la proteína estructural M y a la NS1.

En el **Cuadro 1** se presenta en forma resumida algunas iniciativas en el desarrollo de vacunas contra el dengue, sus diversos enfoques (vivas atenuadas, a sub-unidades, vacunas inactivadas, etc) y las etapas de desarrollo clínico en las que se encuentran.

Vacunas vivas atenuadas quiméricas

La experiencia acumulada hasta ahora con las vacunas vivas atenuadas han demostrado su capacidad de inducir una adecuada respuesta humoral y celular y una adecuada atenuación replicación viral es capaz de estimular al sistema inmunológico sin producir la enfermedad. Es importante que los virus vacunales atenuados contra el dengue tengan una capacidad disminuida o al menos igual de replicarse en el mosquito que el virus de la vacuna contra la fiebre amarilla. Las vacunas atenuadas de reciente generación permiten una modificación genética específica y mejor controlada que la atenuación clásica mediante pasajes sucesivos en cultivos celulares, lo que le confiere una mayor estabilidad genética del producto recombinante atenuado. Esto ha sido posible mediante el proceso denominado quimerización. La quimerización es el mecanismo mediante el cual los genes estructurales en este caso de un flavivirus son reemplazados por genes homólogos de otros flavivirus para producir la atenuación. Hoy en día se tienen varios modelos de vacunas quiméricas contra el dengue. La primera quimera de dengue fue reportada por Bray y Lay, científicos de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU en 1991 (21). El desarrollo que se encuentra en etapa más avanzada es el que está basado en la quimerización del virus vacunal atenuado contra la fiebre amarilla (cepa 17D) al cual se le insertan genes que codifican proteínas del virus salvaje del dengue. Esta vacuna fue desarrollada por Guirakhoo y colaboradores en Acambis (ahora es parte de sanofi pasteur) en el año 2000 (22). Cabe destacar que hoy en día la vacuna contra la fiebre amarilla es obtenida por atenuación convencional del virus, más de 500 millones de dosis en el mundo han sido administradas desde su disponibilidad y no se ha demostrado transmisibilidad en el mosquito, debido a su baja capacidad de replicación. El hecho de ser un flavivirus, transmitido por el mismo vector que el virus del dengue, tener un genoma (17D) notablemente estable comparado con otros virus ARN, probablemente debido a

Cuadro 1
Algunas vacunas contra el dengue en desarrollo (lista no exhaustiva)

Tipo de Vacuna	Propietario o Institución que la desarrolla	Características	Fase del Desarrollo Clínico
Viva, atenuada molecularmente			
Tecnología química:			
Tetavalente (TV) (en FA)	Sanofi Pasteur (sp)/Acambis (ahora es parte de sp)	Clon de ADNc recombinante de virus de la Fiebre amarilla, cepa vacunal 17D, con reemplazo e inserción de genes que expresan proteínas prM y E del virus dengue	Fase I completada. Actualmente en Fase IIb, en preparación para fase III
TV (en DENV-4),	NIH	Clon de ADNc recombinante del DENV-4, con reemplazo e inserción de genes que expresan proteínas prM y E de los virus del dengue (DENV-4 vivo atenuado)	Pre-clínica, Fase I, para formulación BV (DENV-1,4)
TV (en DENV-2)	In Viragen/CDC	Clon de ADNc recombinante del DENV-2, con reemplazo e inserción de genes que expresan proteínas prM y E de los virus del dengue (DENV-2 vivo atenuado)	I
Clon infeccioso:			
Monovalente (MV) DENV-4	NIAID, NIH	Delección de 30 nucleótidos de la región 3' UTR de DENV-4 y posterior mutación en el constructo rDEN4A30 (3 diferentes: rDEN4A30-200-201; rDEN4A30-436-437; y rDEN4A30-4995)	I para formulación rDEN4A30-200-201
Inactivada:			
A sub-unidades:			
MV DENV-4 (E)		Proteínas truncadas de E de DENV-4 en levaduras de <i>Pichia pastoris</i>	Pre-clínica, en monos y ratones
MV DENV-1 (DIII)	IPK-CIGB	Proteínas de fusión recombinante E (DIII) con adyuvante de Freund	Pre-clínica, en monos
MV DENV-2 (DIII)+ cápside		Proteína de fusión de E (DIII) + cápside, expresadas en <i>Escherichia coli</i>	Pre-clínica, en ratones
TV consenso de DIII (cED III)	National Institute of Research in Health, Taiwan	cED III de los 4 serotipos de dengue + AIPO ₄	Pre-clínica, en ratones
TV Sub-unidad, recombinante	Hawaii Biotech Inc	Proteína E truncada en un 80% y expresada en células de <i>Drosophila melanogaster</i> + diversas combinaciones de adyuvantes	Preclínica, en ratones y monos
Vectores virales:			
TV (en adenovirus)	GenPhar Inc /NMRC	Mezcla de 2 constructos de vectores de adenovirus no replicativos (CA ₁ Vax-DEN1,2+CA ₂ Vax-DEN2,4=CA ₂ VaxTV). Además, uso de CMV como promotor para la expresión de cantidades adecuadas de prM y E	Preclínica, inmunogénica en monos
MV (en virus vacunal del sarampión, cepa Schwarz)	Instituto Pasteur de Paris	El virus vacunal del sarampión actúa como vector del DIII de la proteína E fusionado al ectodominio de la proteína M (ectoM) del DENV-1.	Preclínica, en ratones.
ADN recombinante:			
Interacción en Ácidos Nucleicos	NMRC	Unión covalente de psoralen (irradiado con UV-A) a residuos de pirimidina para inhibir replicación viral	Preclínica, inmunogénica en ratones
Pseudo-viriones:			
Replicones	Sanofi pasteur	Tecnología química con delección del gen de la cápside, con capacidad de replicarse en cultivos celulares expresando el gen de la cápside, pero sin capacidad de replicación en el células diana de vacunados.	Pre-clínica

Vacunas contra el dengue en desarrollo

la baja tasa de error de su ARN-polimerasa y la experiencia acumulada en todos estos años de su utilización, permitieron avanzar en el concepto de quimerización de este virus vacunal contra la fiebre amarilla para obtener una vacuna recombinante contra el dengue. Brevemente, el mecanismo de construcción se realiza partiendo del ARN del virus vacunal 17D de la fiebre amarilla, del cual se obtiene un clon de ADN complementario (ADNc) de longitud completa, con todas sus proteínas estructurales y estructurales. A este ADNc de la cepa 17D, se le extraen los genes que codifican a las proteínas estructurales prM y E, los cuales son reemplazados por los de la prM y E de cada serotipo del virus del dengue, de forma separada, obteniéndose de esta forma un ADNc quimérico. Este ADNc quimérico se transcribe a ARN, se introduce por electroporación en células Vero donde el virus quimérico crecerá y se replicará, utilizando la maquinaria de replicación del virus de la fiebre amarilla y conteniendo en su superficie los antígenos inmunizantes, es decir, las proteínas de prM y E del dengue, los cuales serán los blancos de la respuesta inmunitaria, una vez inyectada la vacuna. Esta vacuna quimérica tetravalente ha demostrado una alta estabilidad genotípica y fenotípica en cultivos celulares y en las etapas de desarrollo y producción de los lotes de cepas para la vacuna (19). Estudios *in vitro* demostraron que los virus quiméricos de esta vacuna desarrollada por sanofi pasteur tienen una cinética de crecimiento similar a la de sus virus de dengue parentales salvajes y a la de la cepa 17D del virus vacunal contra la fiebre amarilla. Además, la infección de células dendríticas estuvo acompañada de una producción limitada de citocinas pro-inflamatorias y de una expresión consistente de IFN tipo 1 antiviral. Durante los estudios pre-clínicos, esta vacuna tetravalente indujo una respuesta de anticuerpos protectora de la infección contra los serotipos salvajes de dengue a los que fueron expuestos los monos luego de ser vacunados. Además produjo una viremia limitada, fue menos neurovirulenta que la vacuna 17D de la

fiebre amarilla en monos y ratones lactantes y no infectó a mosquitos por vía oral. Actualmente esta vacuna completó la fase I de investigación clínica en EEUU, Australia, Asia y América Latina y se están llevando a cabo diversos estudios fase II en poblaciones endémicas de diversos países de Asia y América Latina, tanto en adultos, adolescentes y niños desde los 12 meses a los 45 años de edad con un esquema de 3 dosis, por vía subcutánea (23). Interesantemente se ha observado una respuesta *priming* en voluntarios que recibieron previamente una dosis de vacuna contra la fiebre amarilla. En 2010, comenzó un estudio a gran escala fase IIB en Tailandia donde se incluyeron a más de 4000 niños de 4 a 11 años de edad. Hasta el momento, se han aplicado más de 5000 primeras dosis de vacuna tetravalente contra el dengue en adultos, adolescentes y niños y no se han reportado casos severos de dengue debidos a la aplicación de la vacuna, independientemente del estado inmune previo a flavivirus de los participantes en los ensayos clínicos. Los resultados en cuanto a seguridad y seroconversión obtenidos hasta la fecha respaldan la continuación del programa de desarrollo de esta vacuna y la preparación para iniciar estudios fase III de eficacia en 2011 en varios países endémicos de América Latina y Asia.

Aparte de la utilización del virus 17D de la vacuna contra la fiebre amarilla, se ha usado también al mismo virus del Dengue (DENV-2), atenuado, como esqueleto para la elaboración de vacunas contra el dengue, sustituyéndole los genes de prM y E de DENV-1, DENV-3 y DENV-4. Este diseño de vacuna quimérica tetravalente ha sido desarrollado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de EEUU y se han llevado a cabo estudios preclínicos con las formulaciones mono-valentes y luego con la formulación tetravalente en monos (24).

Otro modelo de vacuna en desarrollo mezcla la tecnología quimérica con la técnica de genética reversa llevada a cabo por el laboratorio de enfermedades infecciosas del Instituto Nacional

Zambrano-Mora

de Alergia y Enfermedades Infecciosas de EEUU (NIAID). En clones de ADNc del DENV-4 y del DENV-1, realizaron la delección de 30 nucleótidos (referida también como $\Delta 30$) en la región 3' no traducida del virus (UTR). En particular, se le realizó la delección de ciertos nucleótidos (10748-1057) al DENV-4 (rDEN4 $\Delta 30$), mostrando ser segura e inmunogénica en animales y en voluntarios humanos, y mantuvo su estabilidad genética luego de su replicación en humanos. Sin embargo, debido a que algunos vacunados que recibieron formulaciones elevadas, presentaron rash asintomático, neutropenia y aumento de transaminasas, se decidió introducir una mutación adicional en el proceso, lo que dio origen a la vacuna candidata rDEN4 $\Delta 30$ -200-201 que retuvo su inmunogenicidad, mejorando la seguridad (18). Sin embargo, para los serotipos DENV-2 y DENV-3 no se logró lo mismo. Por este motivo se agregó a este proceso, la quimerización en base a la vacuna monovalente candidata DEN4 $\Delta 30$ a la cual se le reemplazaron los genes de las proteínas estructurales prM y E del DENV-2 y DENV-3 (conocidas como DEN2/ DEN4 $\Delta 30$ y DEN3/ DEN4 $\Delta 30$). Estas vacunas están siendo probadas en animales y se espera por combinaciones tetravalentes que pudieran permitir el inicio de estudios en humanos próximamente (25,26).

Vacunas inactivadas

Si bien las vacunas inactivadas ofrecen la ventaja de su seguridad, haciendo posible su uso en personas con compromiso inmunológico, pueden no llegar a ser tan inmunogénicas como las vivas atenuadas probablemente por no producir una adecuada inmunidad Th-1, ameritando la adición de un adyuvante en su formulación y/o la necesidad de múltiples dosis para proveer una inmunidad duradera, en particular para individuos no expuestos a flavivirus o viviendo en regiones no endémicas (indicación para viajeros, o trabajadores temporales en países endémicos de dengue, o personal militar). (18,19). No obstante, el WRAIR y el Naval Medical Research Center

(NMRC) de los EEUU conjuntamente están probando estrategias de primovacuna-refuerzo con diferentes modelos de vacunas: inactivadas, a sub-unidades, vivas atenuadas, en administración secuencial o concomitante, logrando en ensayos preclínicos en monos respuestas inmunológicas a los 4 serotipos, y con un aumento de anticuerpos luego de la vacunación de refuerzo en varias de estas combinaciones (27). La aplicabilidad de estos esquemas combinando o alternando diferentes diseños de vacunas puede resultar compleja y propensa a errores logísticos al momento de su aplicación en el terreno, en la secuencia de aplicación o combinación correcta de vacunas diferentes contra el dengue, con particular dificultad al tratar de adaptarlas dentro de los calendarios actuales de vacunación en pediatría.

Vacunas pseudo-infecciosas

Esta es otro de los interesantes y novedosos diseños de vacunas contra el dengue: Las vacunas por replicación incompetente o pseudo-infecciosas. Usando el genoma de otro flavivirus, el virus del Oeste del Nilo, se le elimina el gen de la cápside, lo que le permite a este virus modificado un solo ciclo de infección en los vacunados (replicación incompetente, llamado también RepliVax WN). Para crear un constructo contra el dengue, a RepliVax WN se le reemplazan sus genes prME por los del DENV-2, obteniéndose el constructo quimérico al que se ha denominado RepliVax D2, y al que se le hacen mutaciones adicionales en prME, obteniéndose finalmente el candidato RepliVax D2.2 que posee una mejor capacidad de crecimiento en líneas celulares. Al producirse una sola replicación en el vacunado, estos virus modificados, llamados también pseudo-infecciosos, pueden entonces infectar una sola vez células normales, y estas células infectadas pueden liberar partículas "pseudo-virales" (*virus-like particles*) conteniendo prME capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria adecuada a estos antígenos, pero sin los problemas potenciales de seguridad de las vacunas vivas atenuadas, porque ameritarían

Vacunas contra el dengue en desarrollo

sólo una replicación en el huésped. Estas vacunas replican muy bien en células Vero las que las hace adecuadas para producción a gran escala, pero pueden no llegar a inducir niveles elevados de anticuerpos. Aún no están disponibles formulaciones tetravalentes y el prototipo monovalente (RepliVax D2.2) se encuentra en etapa preclínica, habiendo demostrado ser inmunogénico en ratones (28).

Vacunas contra sub-unidades recombinantes

Hawaii Biotechnology (EEUU) ha desarrollado una vacuna recombinante que contiene el 80% del amino terminal de la proteína E del dengue 2 (denominado r80E) producidas en células de *Drosophila melanogaster*. Ya que la vacunas a sub-unidades por sí mismas no producen una gran respuesta inmunitaria, será necesario agregarles algún adyuvante. Por esta razón se han estudiado en modelos animales, diferentes formulaciones de 2 dosis de vacuna contra el DENV-2 a base de adyuvantes del tipo de sales de aluminio, o combinando aluminio con saponinas (QS1) o el MPL (Monofosforil Lípido A), (llamados ASO4, ASO5, o ASO8, dependiendo de la combinación de adyuvantes). Estas formulaciones se encuentran en etapa pre-clínica y han mostrado capacidad inmunogénica en experimentos con monos. (29). Este tipo de sub-unidades recombinantes es difícil de producir en grandes cantidades y la producción de formulaciones tetravalentes podría resultar costosa. Además de la vacuna candidata de Hawaii Biotech., el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba han desarrollado vacunas a subunidades. La primera de ellas fue desarrollada en levaduras de *Pichia pastoris* que expresaban las proteínas E truncadas del DENV-4, resultando ser inmunogénicas en ratones y monos (30). Posteriormente desarrollaron una vacuna monovalente a base de proteínas de fusión recombinante que contienen el DIII de la Envoltura del DENV-1 con hidróxido de aluminio (AlOH) como adyuvante, sin embargo esta formulación no resultó inmunogénica. Al usar adyuvante de Freund,

obtuvieron una respuesta protectora de viremia en monos (31). Más recientemente han desarrollado una nueva vacuna quimérica a sub-unidad, que contiene la proteína de fusión del DIII de la Envoltura y la Cápside del DENV-2, expresadas en *E. coli*. Los estudios en ratones demostraron una respuesta inmunológica tanto humoral como celular (32). Por otra parte, el Instituto Nacional de Investigación de Salud de Taiwan ha desarrollado un prototipo tetravalente de vacuna contra el dengue compuesto por un consenso del DIII de la proteína de Envoltura (denominado cED III) de los 4 serotipos, con fosfato de aluminio ($AlPO_4$) como adyuvante. El consenso no es más que la selección de una secuencia definida de alineación de aminoácidos de 5 cepas de los serotipos DENV-1,-3 y -4 y de 13 cepas de DENV-2. Esta vacuna ha sido probada en ratones, y ha logrado producir una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra los 4 serotipos, sin embargo, el consenso para el serotipo 4 ha mostrado una menor capacidad neutralizante. (33)

Vacunas de ADN

Las vacunas a ADN consisten en plásmidos que contienen la secuencia genérica específica de proteínas o epítopes del virus del dengue. Dicho plásmido contiene una secuencia promotora y de terminación que conduce la transcripción a ARN en el vacunado. A partir del ARN transcrito se producen entonces las proteínas antigénicas específicas que luego le son presentadas al sistema inmune a través de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), estos antígenos son capaces de desencadenar respuestas humorales y celulares. La administración de la vacuna sería por vía intramuscular, para ser captada por células musculares y dendríticas. Como ventajas para este prototipo de vacuna a ADN se han descrito su capacidad de poder agregar nuevos genes a la vacuna, de preparación relativamente simple, no requieren cadena de frío como las vacunas convencionales y su menor reactogenicidad. Entre sus desventajas están la capacidad disminuida

Zambrano-Mora

para producir respuesta inmunitaria, el costo de su elaboración y el riesgo teórico de integración del ácido nucleico en el ADN cromosomal del vacunado, lo que potencialmente podría activar oncogenes o provocar la inactivación de genes supresores de tumores o la inducción de anticuerpos anti-ADN que podrían conllevar a enfermedades autoinmunes. Esto no ha sido demostrado en modelos animales (en ratones proclives o no a lupus, y en conejos) e incluso este tipo de diseño está siendo propuesto como una estrategia para el manejo de enfermedades autoinmunes. Los primeros diseños de vacunas ADN contra el dengue se probaron en animales a finales de la década de 1990 (34) y continúa en fase pre-clínica en monos, desarrollo que está siendo llevado por la Naval Medical Research Center de EEUU (35).

Para mejorar la respuesta inmunológica se necesitaría de adyuvantes u otras estrategias también innovadoras de entrega del antígeno, como lo es la electroporación, la cual consiste en aplicar durante la inyección de la vacuna y a través de un sistema de aguja con electrodos, un estímulo mínimo eléctrico de milisegundos de duración, que permite la apertura de poros en la membrana de las células musculares, facilitando la entrada del antígeno. Al ceder el estímulo eléctrico, se cierran los poros de la membrana y cantidades suficientes del antígeno quedan disponibles en el interior de las células blanco (36). La electroporación en un modelo de vacuna a ADN contra los cuatro serotipos del dengue ya se ha probado en ratones con resultados preliminares interesantes, la factibilidad del uso de estos sistemas sofisticados de entrega del antígeno y los controles adecuados para verificar su adecuado funcionamiento todavía necesitan ser definidos.

PERSPECTIVAS

Como se ha podido apreciar, pocas vacunas han tenido un desarrollo con tecnologías innovadoras tan diversas, basadas principalmente en tecnología recombinante como lo ha sido la va-

cuna contra el dengue y a pesar de ello, ninguna de ellas está disponible aún para su uso. Una de las inquietudes que no ha logrado ser respondida por científicos en el mundo entero acerca del mecanismo inmunológico que lleva a cuadros severos de dengue en particular en algunos casos de infecciones secundarias, ha derivado en las mismas preguntas para el desarrollo de vacunas vivas atenuadas. Existe un modelo de vacuna (viva atenuada quimérica tetravalente) que se encuentra en fase preparatoria para iniciar ensayos clínicos de fase III y por el momento no se ha descrito el fenómeno de ADE en participantes vacunados. Esta vacuna hasta ahora lleva más de 6 años de estudios y ensayos clínicos en diversas regiones geográficas y poblaciones en amplios grupos de edades. Entre tanto, se ha trabajado en la elaboración y actualización de guías para la evaluación de vacunas contra el dengue en ensayos clínicos, se ha trabajado en guías para la armonización de pruebas de laboratorio que pretenden la estandarización de técnicas de medición de anticuerpos neutralizantes y también se han elaborado guías para la evaluación por las autoridades reguladoras de nuevas vacunas en el proceso de registro y comercialización. En este sentido, hoy en día se cuenta únicamente con guías para vacunas vivas atenuadas contra el dengue. Por otra parte, se requiere de un trabajo multidisciplinario, donde los desarrolladores y productores de estas vacunas, las organizaciones gubernamentales (agencias reguladoras) y no gubernamentales (OMS, Organización Panamericana de la Salud [OPS], Pediatric Dengue Vaccine Initiative [PDVI]), y expertos en las áreas clínica, de inmunología, microbiología provenientes de regiones endémicas o no, entre otros, trabajen de forma conjunta con el objetivo final de disponer de vacunas contra el dengue y su eventual introducción en calendarios de vacunación en los países que así lo requieran. Por este motivo, y ante la perspectiva de que en los próximos años sea posible contar con vacunas contra el dengue, se ha iniciado la elaboración de guías al respecto con una participación y colaboración

Vacunas contra el dengue en desarrollo

multidisciplinaria. La OMS ha publicado varias guías en este sentido, tales como:

- Guías para la realización de ensayos clínicos de vacunas contra el dengue (37)
- Guías para el test de neutralización por reducción de placas de anticuerpos humanos contra el virus del dengue (38)
- Guías para la producción y control de calidad de vacunas candidatas (vivas) tetravalentes contra el dengue (39,40)

Algunas de estas guías han ido actualizándose en la medida en que se va adquiriendo más experiencia en el desarrollo de estas vacunas.

Con respecto a la preocupación acerca de la seguridad de las vacunas contra el dengue y la teoría de una potencial generación de respuesta inmunitario tipo ADE por vacunas vivas atenuadas, en las guías para la realización de ensayos clínicos en áreas endémicas se establece que “existe un consenso internacional de que el desarrollo clínico de una vacuna contra el dengue no debería ser evitado por ciertas preocupaciones hipotéticas sobre la seguridad” (37). El desarrollo clínico en etapas subsiguientes e incluso en estudios fase IV quizás permita mostrar si este riesgo teórico puede –o no– ser generado por este tipo de vacunas.

Las estrategias actuales que se han implementado para el control del vector en sus diversas formas evolutivas, y en general para el control de la infección, no han logrado ser suficientes para detener el avance de esta enfermedad. El poder disponer de una vacuna contra el dengue en los próximos años, indudablemente será una herramienta complementaria a las medidas de control y prevención y a las estrategias actuales que se están llevando en las regiones afectadas por esta enfermedad. Igualmente, esta vacuna podrá ser de utilidad para individuos (turistas, personal militar, trabajadores temporales) procedentes de regiones no endémicas que viajen a regiones endémicas del dengue.

Declaración de conflicto de interés

El autor es empleado de Sanofi Pasteur. Los comentarios emitidos en el artículo corresponden a la opinión del autor.

REFERENCIAS

1. **Guzmán MG, García G, Kourí G.** Temas de Actualidad: El Dengue y Dengue Hemorrágico: Prioridades de Investigación. *Rev Panam Salud Pública* 2006; 19(3):204-15.
2. **San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckennooghe A, Dayan G, et al** The epidemiology of Dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82(1):128-35.
3. **Organización Panamericana de la Salud.** Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). Washington, DC, Pan American Health Organization, [1 screen]. Disponible en URL: <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>
4. **Organización Panamericana de la Salud.** Alertas Epidemiológicas. Alerta epidemiológica. Brote de dengue en las Américas, 7 Julio 2010 [7 screens]. Disponible en URL: <http://new.paho.org/hq/index.php?lang=es>
5. **Whahab HA, Yusof R, Raham NA.** A Search for Vaccines and Therapeutic for Dengue: A Review. *Current Computer-Aided Drug Design* 2007; 3:101-12.
6. **Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenchjes E, et al.** Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell* 2002; 108:717 – 25.
7. **Deubel V.** Approche vaccinale de la dengue. *Médecine et Maladies infectieuses* 1995; 25(7):696-701.
8. **Anónimo.** Dengue Vaccine. *JAMA* 1945; 128(14):1026-7.
9. **Simmons JS.** Dengue Fever. *Am J Trop Med Hyg* 1931; XI(2):77-101.
10. **Vaughn DW, Withehead SS, Durbin AP.** Viral Vaccines. Dengue. En: Barret ADT and Stanberry LW, editores. *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*. Oxford: Elsevier; 2009. Vol III, Chapt 19, pp. 289-324.
11. **Sabin AB, Schlesinger W.** Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science* 1945; 101(2364):640-2.
12. **Wissemann Jr ChL, Sweet BH, Rosenzweig EC, Eylar OR.** Attenuated living Type 1 Dengue. *Vaccine*. *Am J Trop Med Hyg* 1963; 12:620-2.
13. **Bellanti JA, Bourke ATC, Buescher EL, Cadigan FC, Cole GA, Batawi YE et al.** Report of Dengue vaccine field trial in the Caribbean, 1963: A collaborative study. *Bull World Health Organ* 1966; 35(1):93.
14. **Henchal EA, Putnak R.** The Dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3(4):376-96.
15. **Bhamarapravati N, Yoksan Sutee.** Live attenuated tetravalent dengue vaccine. En: Gubler DJ and Kuno G, editores. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*.

Zambrano-Mora

- Wallingford: CABI Publishing; 1997. pp. 367-77.
16. **Halstead SB, Vaughn DW.** Dengue Vaccines. En: Plotkin S, Ornstein W, Offit P, editores. Vaccines. 5ta ed. Philadelphia: WB Saunders; 2008. pp.1155-61.
 17. **Chanthavanich P, Luxemburger C, Sirivichayakul C, Lapphra K, Pengsaa K, Yoksan S et al** short report: Immune response and occurrence of dengue infection in Thai children three to eight years after vaccination with live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75(1):26-8.
 18. **Webster DP, Farrar J, Rowland-Jones S.** Progress towards a dengue vaccine. [Review]. [fe de erratas publicada en *Lancet Infect Dis* 2010; 10:304]. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:678-87.
 19. **Guy B, Guirakhoo F, Barban V, Higgs S, Monath T and Lang J.** Preclinical and clinical development of YFV-17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. (Review). *Vaccine* 2010; 28:632-49
 20. **Guilarde AO, Turchi MD, Siqueira Jr JB, Feres VC, Rocha B, Levi JE et al.** Dengue and Dengue hemorrhagic fever among adults: clinical outcomes related to viremia, serotypes and antibody response. *J Infect Dis* 2008; 197(6):817-24
 21. **Bray M, Lay C-J.** Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural protein genes. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:10342-6
 22. **Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers TJ, Zhang ZX, Soike K, Ratterree M et al.** Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *J Virol* 2000; 74(12):5477-85.
 23. **Lang J.** Recent progress on sanofi pasteur's dengue vaccine candidate. *Journal of Clinical Virology* 2009; 46(Suppl 2):S20-S24.
 24. **Huang-H CY, Butrapet S, Pierro DJ, Chang JG-J, Hunt AR, Bhamarapravati N et al.** 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):3020-28.
 25. **Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR.** Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5:518-28.
 26. **Edelman R.** Dengue vaccines approach the finish line. *CID* 2007; 45(Suppl1):S56-60.
 27. **Simmons M, Burgess Y, Lynch J, Putnak R.** Protection against dengue virus by non-replicating and live attenuated vaccines used together in a prime boost vaccination strategy. *Virology* 2010; 396:280-8.
 28. **Suzuki R, Winkelman ER, Mason Peter W.** Construction and characterization of a single-cycle chimeric flavivirus vaccine candidate that protects mice against lethal challenge with dengue virus type 2. *J Virol* 2009; 83(4):1870-80.
 29. **Putnak R, Coller BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I et al.** An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine* 2005; 23:4442-52.
 30. **Guzmán MG, Rodríguez R, Rosmari R, Hermida H, Alvarez M, Lazo L et al.** Induction of neutralizing antibodies and partial protection from viral challenge in *Macaca fascicularis* immunized with Recombinant Dengue 4 virus Envelope glycoprotein expressed in *Pichia pastoris*. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69(2):129-34.
 31. **Bernardo L, Izquierdo A, Alvarez M, Rosario D, Prado I, López C et al.** Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue 1 envelope protein in non-human primates. *Antiviral Research* 2008; 80:194-9.
 32. **Valdés I, Bernardo L, Gil L, Pavon A, Lazo L, López C et al.** A novel fusion protein domain III-capsid from dengue-2, in a highly aggregated form, induces a functional immune response and protection in mice. *Virology* 2009; 394:249-58.
 33. **Lengh CH, Liu SJ, Tsai JP, Li YS, Chen MY, Liu HH et al.** A novel dengue vaccine candidate that induces cross-neutralizing antibodies and memory immunity. *Microbes and Infection*. 2009; 11(2):288-95.
 34. **Kochel T, Wu SJ, Raviprakash K, Hobart P, Hoffman S, Porter K and Hayes C.** Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 1997;15:547-52.
 35. **Blair PJ, Kochel TJ, Raviprakash K, Guevara C, Salazar M, Wu SJ et al.** Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 pre-membrane and envelope DNA vaccine in *Aotus nancymae* monkeys. *Vaccine* 2006; 24:1427-32.
 36. **Ramanathand MP, Kuo YC, Selling BH, Li Q, Sardesai NY, Kim JJ, et al.** Development of a novel DNA SynCon™ tetravalent dengue vaccine that elicits immune responses against four serotypes. *Vaccine* 2009; 27:6444-53.
 37. **World Health Organization.** Immunization, Vaccines & Immunobiologicals. Guidelines for the clinical evaluation of dengue vaccines in endemic areas, 2008. WHO/IVB/08.12. Disponible en URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_IVB_08.12_eng.pdf
 38. **World Health Organization.** Immunization, Vaccines & Immunobiologicals. Guidelines for plaque reduction neutralization test for human antibodies to dengue viruses, 2007. WHO/IVB/07.07. Disponible en URL: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/WHO_IVB_07.07_eng.pdf

Vacunas contra el dengue en desarrollo

- 39. World Health Organization.** Guidelines for the production and quality control of candidate tetravalent dengue virus vaccines (live). WHO Technical Report Series N° 932, 2006 Annex 1, pp-44-72 Disponible en URL: http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/dengue/TRS932Annex%201_Dengue%20virus%20vacc%20live.pdf
- 40. World Health Organization.** Meeting Report. WHO working group on Technical specifications for manufacture and evaluation of dengue vaccines, May 2009. pp 1-38. Disponible en URL: http://www.who.int/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/dengue/DENGUE_2009_Final_WHO_REP_2010.pdf