

Título: La respuesta inmune celular desempeña un papel importante en la protección contra el virus dengue en el modelo de encefalitis viral en ratones.

Autores: Lic. Lázaro Gil González (lazaro.gil@cigb.edu.cu), Carlos López, Aracelys Blanco, Laura Lazo, Jorge Martín, Iris Valdés, Yaremis Romero, Yassel Figueroa, Gerardo Guillén y Lisset Hermida.

Centro de procedencia: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Introducción

El virus Dengue (VD) es un patógeno humano perteneciente a la familia *Flaviviridae*, que se transmite al hombre por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*, infectado con uno de los cuatro serotipos que existen de este patógeno. La infección usualmente cursa desde el estadio asintomático hasta el severo, llegando hasta los síndromes conocidos como fiebre hemorrágica del Dengue y *shock* por Dengue, ambos con amenaza para la vida (6). Por mucho tiempo, los investigadores han propuesto que la generación de anticuerpos neutralizantes constituye un requisito para obtener un adecuado nivel de protección contra el virus. No obstante, el VD es un virus no citopático que sobre-regula la expresión en membrana de genes para las moléculas del sistema MHC clase I en monocitos, macrófagos y células dendríticas (14). Por otra parte, la respuesta inmune celular es la principal arma del sistema inmune adaptativo, el cual se activa contra los virus no citopáticos tales como el Dengue. Tan pronto el virus entra a la célula es necesario destruirlo para eliminarlo completamente. Ésta es la razón por la que varios autores han propuesto que la inmunidad mediada por células constituye un mecanismo de protección crucial contra la infección por el virus Dengue (5, 24). En la actualidad, uno de los problemas en la investigación del Dengue es la carencia de un modelo animal que de manera adecuada reproduzca los síntomas clínicos de la enfermedad en el humano (6). Sin embargo, el modelo murino de encefalitis viral se ha usado ampliamente para replicar los efectos de los virus salvajes aislados de humanos y para evaluar diferentes candidatos vacunales en estudio (8, 13, 25). La inoculación intraperitoneal del virus Dengue en ratones induce una viremia de corta duración que se controla rápidamente por el sistema inmune innato (1); no obstante, induce protección luego del reto intracraneal con el virus homólogo (8, 13). Dada la gran cantidad de investigaciones en curso sobre la inmunidad mediada por células en ratones (23), este modelo constituye una herramienta apropiada para caracterizar la respuesta inmunológica contra la infección por el virus Dengue. En este trabajo estudiamos algunos parámetros de la respuesta inmune humoral y celular en ratones generada luego de la administración de una dosis infectiva única del virus serotipo 2. Además, se evaluó la contribución *in vitro* e *in vivo* de las poblaciones de células CD4 y CD8 en la respuesta inmune contra el virus Dengue. Los resultados obtenidos constituyen un nuevo hallazgo que contribuye al conocimiento de los mecanismos que median la protección contra el virus Dengue.

Diseño metodológico

Inmunización de ratones

A 65 animales se le administró una sola dosis de $1,1 \times 10^5$ unidades formadoras de placas virales (ufp)/mL de VD2 (A-15, 5 PR), preparada a partir de un homogenizado de cerebro de ratón lactante infectado con este virus, sin adyuvante. Treinta días después de la dosis, a 10 ratones se les extrajo sangre y las células del bazo en condiciones asépticas, para la determinación de la repuesta inmune humoral y celular. Tres días antes del reto viral, los animales restantes se dividieron en 4 subgrupos (A, B, C y D) de 14 animales cada uno. Los subgrupos A y B se inocularon con una dosis de 100 μ g de un AcM purificado (clon YTS 191.1) que elimina las poblaciones celulares CD4+, y 100 μ g de un AcM purificado (clon YTS 169.4) que elimina las poblaciones celulares CD8+, respectivamente. El subgrupo C se inoculó con PBS y el D con el AcM 2C4 (específico para la región V3 de la glicoproteína gp 120 del HIV-1 aislamiento MN) como control de isotipo. Al cabo de las 72 h, a dos animales de cada subgrupo se les extrajo las células del bazo y se analizó la deficiencia de células CD4+ y CD8+ por citometría de flujo, según correspondía. Más de un 94% de las poblaciones celulares estuvieron deficientes en los animales inoculados con los AcM específicos.

El ensayo de protección se realizó 30 días después de la última dosis. Para ello, los animales se inocularon intracranalmente con 20 μ L de una preparación que contuvo 50 DL50 (dosis que provoca la muerte al 50% de los animales, dosis letal media) de una cepa viral neuroadaptada. Posteriormente, los ratones se mantuvieron en observación por 21 días y se llevó el control de la morbilidad y la mortalidad en el tiempo.

Ensayo inmunoenzimático de fase sólida

La presencia de anticuerpos antivirales en los sueros de los animales inmunizados se determinó por un sistema de ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) de captura, según Lazo y cols., 2007 (13). El título de los sueros se definió como el recíproco de la máxima dilución para la cual los valores de absorbancia correspondientes a diluciones del suero frente al antígeno viral fueron mayores o iguales al doble de la absorbancia obtenida frente al antígeno control (CN).

Ensayo de neutralización *in vitro*

Se empleó el método de reducción del número de placas (PRNT, del inglés, *plaque-reduction neutralization test*) en la línea celular BHK-21 clono 15, según Morens y cols. (1985) (17). El anticuerpo monoclonal 4G2 se empleó como control positivo (10).

Marcaje de células con CFSE y cultivo celular

Para el marcaje con 5,6-carboxyfluoresceína diacetato-succinimidil ester (CFSE, *Molecular Probe, USA*), 2×10^7 esplenocitos/mL en PBS se incubaron con 1 μ M de CFSE durante 5 min a 25°C. La reacción de marcaje se detuvo por adición de un volumen de SFB. A continuación las células se lavaron dos veces con PBS que contuvo SFB al 2%.

Las células del bazo se obtuvieron en condiciones asépticas y los eritrocitos se lisaron por incubación con una solución de NH₄Cl 0,83%. Luego las células se lavaron dos veces con PBS, SFB 2% y se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL (*Gibco, UK*), glutamina 2 mM (*PAA Laboratories, Canada*), 5x10⁻⁵ M de β-mercaptoetanol (*Sigma, USA*) y SFB 5%, a una concentración final de 2x10⁶ células/mL. Finalmente, 2x10⁵ células/pozo se cultivaron en placas de 96 pozos fondo U (*Costar, USA*) con los antígenos correspondientes (103 ufp de las preparaciones virales o la preparación control negativa (mock)). La concanavalina A (ConA) (*Sigma, USA*) se usó como control positivo de estimulación. En todos los experimentos, las estimulaciones se realizaron por duplicado. Luego de 96 h de incubación a 37°C y 5% CO₂, las células y/o el sobrenadante de cultivo de estas se colectaron para posteriores ensayos.

Análisis por citometría de flujo

La expresión de moléculas de superficie y la proliferación celular se evaluó por citometría de flujo como se describe a continuación. En todos los casos, previo al marcaje con los respectivos AcM conjugados a los fluoróforos, las células se incubaron durante 15 min en PBS con azida sódica 0,09% y suero normal de conejo al 2%, para minimizar las interacciones inespecíficas.

Para medir la proliferación celular, esplenocitos marcados con CFSE y estimulados con cada antígeno se incubaron con un AcM específico para la molécula CD8 conjugado a PE (*Serotec Ltd, UK*) durante 30 min a 4°C. En ambos casos las células se lavaron dos veces con PBS, después del marcaje.

Las muestras se analizaron por duplicado y se adquirió 104 células en un citómetro de flujo PasIII (*Partec GmbH, Germany*). Todas las muestras se caracterizaron en cuanto a la intensidad de fluorescencia emitida por los fluoróforos con los que se marcaron y en cuanto a la granulocidad y al tamaño de las células. Estos dos últimos parámetros están dados por la dispersión del láser hacia los lados (SSC-H, del inglés, *side scatter*) y hacia delante (FSC-H, del inglés, *forward scatter*). Los datos obtenidos se salvaron y analizaron posteriormente con el programa WinMDI version 2.8 (*Purdue University, USA*).

El porcentaje de células que proliferó se determinó por selección de la población CFSE^{low}CD8⁺. El índice de división celular (IDC) se calculó empleando la siguiente fórmula:

Porcentaje de células CFSE^{low} con antígeno

Porcentaje de células CFSE^{low} con mock

Un IDC ≥ 3 fue considerado como una respuesta positiva, si (Porcentaje de células CFSE^{low} con antígeno - Porcentaje de células CFSE^{low} con mock) es ≥ 1.

Eliminación selectiva de poblaciones celulares *in vitro*

Para la eliminación selectiva de células CD4⁺ o CD8⁺, se incubaron 5x10⁶ esplenocitos en PBS durante 30 min a 37°C, con 100 µg de un AcM purificado (clone YTS 191.1) que elimina las poblaciones celulares CD4⁺ ó 100 µg de un AcM purificado (clone YTS 169.4) que elimina las poblaciones celulares CD8⁺, respectivamente, y complemento de conejo (*Cedarlane, Canada*). Luego las

células se lavaron dos veces con PBS, SFB 2% y la eliminación de las poblaciones celulares se confirmó por citometría de flujo. Más de un 95% de las poblaciones celulares específicas estuvieron deficientes en los esplenocitos tratados con los AcM.

Detección de citocinas por ELISA

A partir del sobrenadante de cultivo de los esplenocitos previamente estimulados con cada antígeno viral, se determinó la concentración de IFN- γ , mediante un sistema de ELISA de captura. Se empleó el protocolo recomendado por el productor, con algunas modificaciones. El límite de detección de la citocina fue de 4 pg/mL.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.00 (*GraphPad Software, USA*, (<http://www.graphpad.com>)). A los datos obtenidos durante la experimentación se les comprobó la normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov (corrección Dallal-Wilkinson-Liliefors) y la homogeneidad de varianzas por la prueba de Bartlett. Cuando los datos directos o transformados siguieron una distribución normal se aplicó un análisis paramétrico y en caso contrario se aplicó un análisis no paramétrico. Todos los valores con *, ** y *** indican diferencias significativas con $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente.

Resultados y discusión

Respuesta inmune humoral

Ratones BALB/c se inmunizaron con una sola dosis de VD2 preparada a partir de cerebro de ratón lactante infectado con este virus. Como control negativo (CN) un grupo de ratones recibió una dosis de un homogenizado de cerebro de ratón lactante no infectado. Ambos inmunógenos se administraron, sin adyuvante, por vía intraperitoneal. La respuesta inmune humoral generada contra el virus se midió 30 días después de la dosis. Como resultado, todos los animales inmunes a VD2 generaron anticuerpos antivirales contra los cuatro serotipos, mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo de animales control negativo ($p < 0,05$) (Figura 1). Sin embargo, los mayores títulos de anticuerpos se observaron para el serotipo homólogo, mientras que los menores títulos se detectaron contra el serotipo 4. Adicionalmente, el análisis de las subclases IgG2a e IgG1 generadas contra el serotipo homólogo, mostró mayores títulos de anticuerpos de la subclase IgG2a, sugiriendo la inducción de un patrón de respuesta de tipo Th1 (Figura 1B).

Finalmente, la funcionalidad de la respuesta inmune humoral se midió por neutralización *in vitro* de la infección viral. Como resultado, seis de los ocho sueros ensayados mostraron actividad neutralizante contra el serotipo homólogo, con un TPG de 43,5. No se detectó actividad neutralizante contra los serotipos heterólogos (Tabla 1).

Figura 1: Gráfico de la respuesta inmune humoral generada en ratones por la inmunización con VD2.

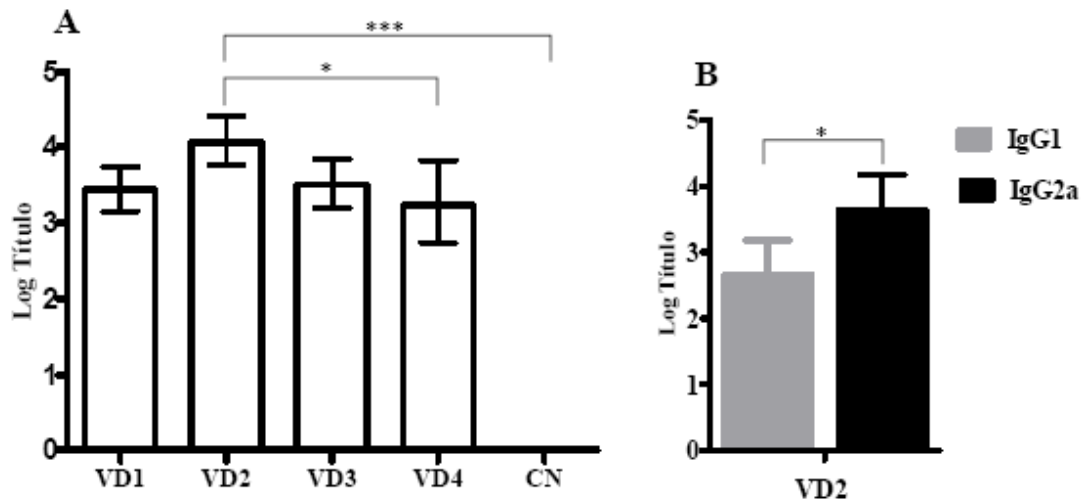


Figura 1: Gráfico de la respuesta inmune humoral generada en ratones por la inmunización con VD2. Los títulos de anticuerpos antivirales se midieron por un sistema de ELISA de captura amplificado. (A) Respuesta de anticuerpos antivirales homotípica y heterotípica. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple *a posteriori* mediante la prueba de Dunn (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$). (B) Patrón de subclases IgG2a e IgG1 contra el virus homólogo. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney (*: $p < 0,05$). Los datos se presentan como la media geométrica con el 95% del intervalo de confianza y son representativos de tres experimentos independientes. (N=8).

Tabla 1: Respuesta homotípica y heterotípica de anticuerpos neutralizantes generada en ratones tras la inmunización con VD2

	Título PRNT ₅₀ ^a			
	VD1	VD2 **	VD3	VD4
TPG ^b	<10	43,5	<10	<10
4G2	1200	1000	840	720

^a El título neutralizante se define como la máxima dilución del suero con la cual se reduce al 50% el número de placas virales.

^b TPG: título promedio geométrico.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple *a posteriori* mediante la prueba de Dunn (**: $p < 0.01$).

Los resultados de este trabajo demuestran que luego de la inoculación con el virus Dengue 2 todos los ratones generaron una buena respuesta inmune humoral, pero la actividad neutralizante se observó sólo contra el virus homólogo. El mismo resultado ha sido reportado para la respuesta inmune humoral en humanos luego de la infección primaria con el virus Dengue (7, 18). De hecho, durante la infección primaria el individuo desarrolla inmunidad de larga duración al serotipo infectivo, pero la inmunidad heteróloga es de corta duración (2, 19). El rol protector de la respuesta inmune humoral en el modelo murino de encefalitis no está

completamente elucidado. Previamente nosotros observamos protección en ratones que no habían desarrollado anticuerpos neutralizantes luego de la inmunización con bajas dosis de virus infeccioso Dengue 2 (datos no publicados). Además, existen varios estudios en animales que reportan la no correlación entre protección y la respuesta inmune humoral generada (24, 28). Por otra parte, nuestro grupo reportó recientemente la protección de ratones inmunizados con la proteína recombinante de la capsida luego del reto con el VD2, sin la generación de anticuerpos antivirales o neutralizantes (13).

Proliferación de las células TCD8+ frente al virus dengue

Con el objetivo de estudiar la inmunidad mediada por células generada por una dosis viral se determinó inicialmente la proliferación de células CD8+ específicas a VD2. Para ello, los esplenocitos marcados con CFSE se cultivaron en presencia de VD2, se colectaron y marcaron con un AcM específico para la molécula CD8. Como se muestra en la figura 2, las células CD8+ provenientes de los animales inmunes a VD2, proliferaron *in vitro* ante la presencia del virus homólogo, con un IDC de $15,23 \pm 1,38$. Por el contrario, los esplenocitos de los animales del grupo control negativo no proliferaron frente al estímulo viral (IDC de $1,71 \pm 0,66$).

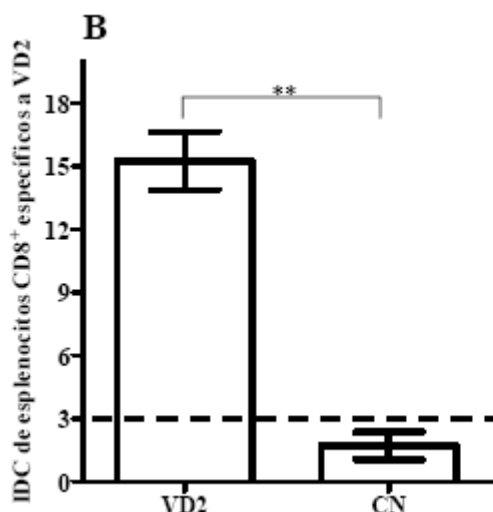


Figura 2: Respuesta proliferativa de esplenocitos CD8+ ante la estimulación *in vitro* con VD2. Gráfico que representa el índice de división celular (IDC) de esplenocitos CD8+ específicos a VD2 de los animales de cada grupo. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney (**: $p < 0.01$). Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. Los gráficos son representativos de dos experimentos independientes. (N=5).

Detección de IFN- γ

Como medida de la funcionalidad de la respuesta inmune mediada por células, inducida por el virus en este modelo, se midió la secreción de IFN- γ en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos estimulados con VD2. La secreción de esta citocina antiviral (21) se ha correlacionado previamente con la actividad citotóxica que se genera contra VD (16). La figura 4A muestra que los esplenocitos provenientes de animales inmunizados con VD2 secretaron altos niveles de IFN- γ ($1487,2 \pm 46,5$ pg/mL). Sin embargo, en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos del grupo control negativo se detectaron bajos niveles de la citocina ($166,9 \pm 27,5$ pg/mL).

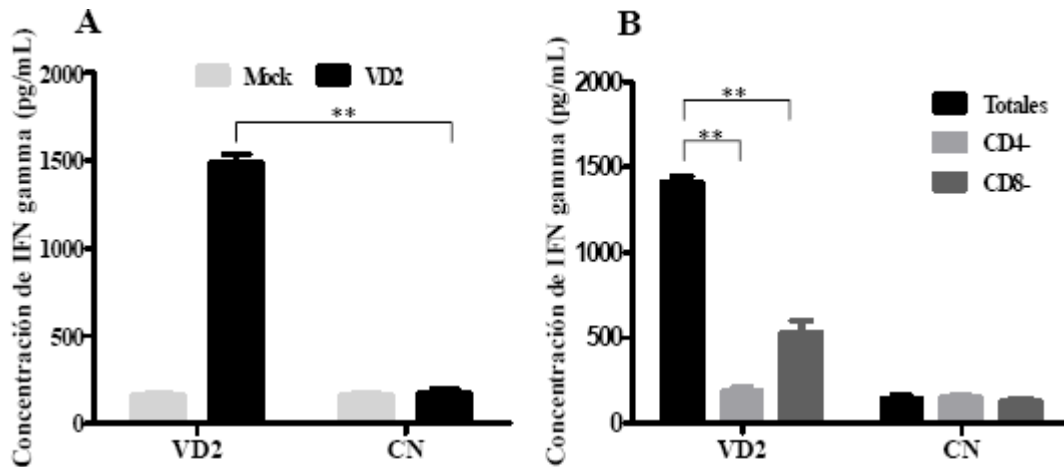


Figura 3: Gráficos que representan la concentración de IFN- γ medida por ELISA.

Los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con VD2 y CN se cultivaron con 10^3 ufp de VD2 o con una preparación control negativo (mock) durante 96 horas. (A) Niveles de secreción de IFN- γ medidos en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos totales. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (**: $p < 0.01$). (B) Niveles de secreción de IFN- γ a partir de esplenocitos deficientes de células CD4 $^+$ o CD8 $^+$, con respecto a esplenocitos totales. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de clasificación doble empleando la prueba de Bonferroni (***: $p < 0.001$). Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. Este ensayo se repitió tres veces con resultados similares. (N=5).

Adicionalmente, se determinó la contribución de las poblaciones celulares CD4 $^+$ y CD8 $^+$ a la secreción de la citocina antiviral. Para ello, los esplenocitos se sometieron a un proceso de eliminación selectiva de las células CD4 $^+$ o CD8 $^+$ y posteriormente se cultivaron con VD2. Como se muestra en la figura 3B, la eliminación de ambas poblaciones celulares afectó significativamente la secreción de IFN- γ ($p < 0.001$), con respecto a los niveles detectados en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos totales.

Estos hallazgos sugieren un posible papel protector de la inmunidad mediada por células en este modelo, lo cual es consistente con las evidencias de este trabajo donde se demuestra la inducción de una respuesta proliferativa de células CD8 en ratones inmunes al Dengue luego de la estimulación con el virus homólogo. Además, las células del bazo re-estimuladas *in vitro* con el virus produjeron altos niveles de IFN gamma, lo que puede desempeñar un rol importante en la actividad antiviral como se reportó previamente (21). De igual forma, la producción de esta citocina provino de células CD8 $^+$, como se ha reportado para otros virus relacionados (11, 26). Específicamente para el VD se ha reportado una relación entre actividad citotóxica CD8 y secreción de IFN- γ (16, 25).

Ensayo de protección

El reto intracraneal de ratones vírgenes con VD neuroadaptado induce una encefalitis que conlleva a la muerte del animal. No obstante, la inoculación previa por vía intraperitoneal con el virus homólogo, genera una respuesta inmune que los protege del desarrollo de la enfermedad (8, 10, 20). Un mes después de la dosis, los animales no sangrados de cada grupo se retaron por vía intracraneal con 50 DL50 de una cepa de VD2 neuroadaptada. Al final del período de

observación, el 100% de los animales inmunes a VD2 sobrevivieron, mientras que todos los animales del grupo control negativo mostraron síntomas de encefalitis y murieron. Sin embargo, la inoculación previa al reto de los animales inmunes a VD2 con un AcM que elimina las poblaciones celulares CD8+, conllevó a la aparición de síntomas de encefalitis y finalmente a la muerte del 50% de los animales. Por el contrario, la eliminación previa al reto de las poblaciones celulares CD4+, no afectó la sobrevivida de los animales inmunes a VD2. Similar comportamiento se observó tras la inoculación del AcM 2C4, empleado como control de isotipo (Figura 4). Los síntomas de encefalitis y la muerte observada en los animales del grupo control negativo no se afectaron por la administración de estos AcMs.

En concordancia con nuestros resultados, Van der Most *et al.* (24) reportaron la contribución de las células CD8 en la protección de ratones, que previamente habían sido inmunizados con el virus quimérico YFV/DV (este virus recombinante contiene los genes prM y E del VD2 en el background genético YFV-17D). Sin embargo, en el presente estudio, nosotros usamos el VD infectivo, lo que permite que la respuesta inmune inducida se dirija contra todos los epítopos naturales del virus. Es probable que las células CD8 de memoria migren hacia el sistema nervioso central luego de la inmunización y como resultado controlen la replicación viral *in situ* luego del reto, como ha sido reportado previamente por Van der Most *et al.* (25).

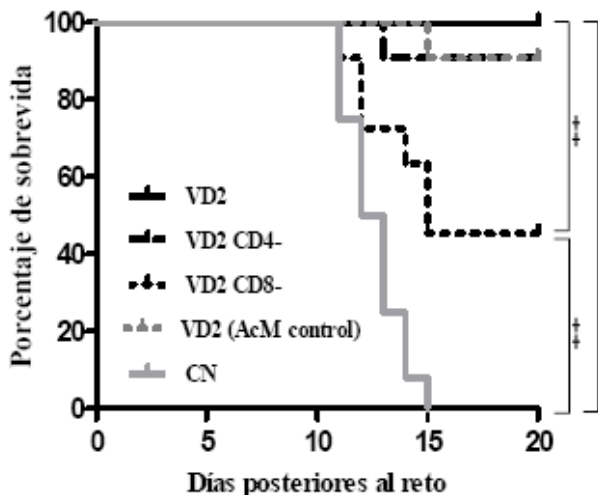


Figura 4: Gráfico que representa los porcentajes de sobrevivida tras el reto intracraneal con una cepa letal de VD2 neuroadaptada (50 DL₅₀).

Curvas de sobrevivida correspondientes a ratones inmunes a VD2 (VD2), ratones inmunes a VD2 deficientes de células CD4⁺ (VD2 CD4-), ratones inmunes a VD2 deficientes de células CD8⁺ (VD2 CD8-), ratones inmunes a VD2 tratados con el AcM 2C4 como control de isotipo [VD2 (AcM control de isotipo)] y ratones controles negativos (CN). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de log-rank (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Los datos son representativos de tres experimentos independientes. (N=12).

Contrario a estos resultados, dos estudios realizados en ratones atribuyen el papel protector sólo a la respuesta humoral. Sin embargo, los resultados no son convincentes ya que Chaturvedi *et al.* (4) emplearon esplenocitos transferidos en los cuales el número de células CD8 es pequeño. Adicionalmente, los anticuerpos administrados pasivamente pudieron haber alcanzado una concentración final en los ratones receptores diferente a la concentración alcanzada luego de la infección natural. Por otra parte, Kyle *et al.* (12) realizaron sus experimentos con ratones deficientes de IFN tipo I y el receptor para el IFN- γ , que constituyen mediadores de la respuesta inmune celular. Nuestros resultados no niegan el rol protector de la

respuesta inmune humoral en el modelo murino. Aunque los niveles de anticuerpos neutralizantes fueron bajos, hubo un 50% de supervivencia en aquellos ratones del grupo de eliminación de células CD8. Este resultado indica que la respuesta inmune humoral es necesaria, pero no suficiente para inducir protección total contra el virus Dengue. Ambas armas del sistema inmune adaptativo son necesarias para la protección. Finalmente observamos que la eliminación *in vivo* de células CD4 no afectó los niveles de protección. Este resultado coincide con los hallazgos de otros estudios que demuestran que las células CD4 no se requirieron luego de la segunda exposición al antígeno para controlar la infección (9, 22, 27). Algunas evidencias sugieren que las células CD4 poseen un efecto programador temprano que contribuye a la estimulación de las células CD8, lo cual garantiza que al menos una parte de la población respondedora, sobreviva como células de memoria de larga duración y éstas a su vez, pueden tener una función efectora tras la reexposición antigénica (3, 15).

Conclusión

El presente trabajo constituye el primer reporte de la inducción de respuesta inmune celular contra el virus del Dengue y su relación con la protección en el modelo de encefalitis viral en ratón. También se demuestra que la respuesta de células T CD8+ desempeña un papel importante en la defensa contra el virus del dengue. Aún no se ha demostrado que este comportamiento sea similar en humanos, por lo que deben realizarse trabajos adicionales para definir el rol de las células T y por consiguiente, el desarrollo de candidatos vacunales basados en la inducción de este tipo de respuesta.

Referencias bibliográficas

1. Brinton MA, and Perelygin AA: Genetic resistance to flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003;60:43–85.
2. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, and Scott RM: A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 1988;38:172–180.
- 10
3. Castellino F, and Germain RN: Cooperation between CD4₊ and CD8₊ T cells: When, Where, and How. *Annu Rev Immunol* 2006;24:519–540.
4. Chaturvedi UC, Tandon P, Mathur A, and Kumar A: Host defense mechanism against dengue virus infection of mice. *J Gen Virol* 1978;39:293–302.
5. Gagnon SJ, Zeng W, Kurane I, and Ennis FA: Identification of two epitopes on the dengue 4 capsid protein recognized by a serotype-specific and a panel of serotype-cross-reactive human CD4₊ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol* 1996;70:141–147.
6. Gubler DJ, and Kuno G: Viral pathogenesis of dengue infections. In: *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. (Gubler DJ, and Kuno G, eds.). CAB International, 1997. 273–275.
7. Halstead SB: Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg* 1974;23:974–982.

8. Hermida L, Rodríguez R, Lazo L, et al.: A dengue-2 envelope fragment inserted within the structure of the P64k meningococcal protein carrier enables a functional immune response against the virus in mice. *J Virol Methods* 2004; 115:41–49.
9. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, and Schoenberger SP: CD4₊ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8₊ T lymphocytes. *Nature* 2003;421:852–856.
10. Kaufman BM, Summers PL, Dubois DR, and Eckels KH: Monoclonal against dengue-2 virus E glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36:427.
11. Keating R, Yue W, Rutigliano JA, So J, Olivas E, Thomas PG, and Doherty PC: Virus-specific CD8₊ T cells in the liver: armed and ready to kill. *J Immunol* 2007;178:2737–2745.
12. Kyle JL, Balsitis SJ, Zhang L, Beatty PR, and Harris E: Antibodies play a greater role than immune cells in heterologous protection against secondary dengue virus infection in a mouse model. *Virology* 2008;380:296–303.
13. Lazo L, Hermida L, Zulueta A, et al.: A recombinant capsid protein from dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine* 2007;25:1064–1070.
14. Lobigs M, Mullbacher A, and Lee E: Evidence that a mechanism for efficient flavivirus budding upregulates MHC class I. *Immunol Cell Biol* 2004;82:184–188.
15. Masopust D, Kaech SM, Wherry EJ, and Ahmed R: The role of programming in memory T-cell development. *Curr Opin Immunol* 2004;16:217–225
16. Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, et al.: T cell response in dengue hemorrhagic fever: Are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol* 2006;176:3821–3829.
17. Morens DM, Halstead SB, and Repik PM: Simplified plaque reduction assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985;22:250–254.
18. Okuno Y, Fukunaga T, Tadano M, Fuki K, Ikeda T, Sheik K, and Ariyoshi H: Serological studies on volunteers inoculated experimentally with a dengue virus strain in 1943. *Biken J* 1983;26:161–163.
19. Sabin AB: Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1952;1:30–50.
20. Schlesinger JJ, Brandis MW, and Walsh EE: Protection of mice against dengue-2 encephalitis by immunization with dengue-2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol* 1987;68:853.
21. Shresta S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR, and Harris E: Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *J Virol* 2004;78:2701–2710.
22. Sun JC, and Bevan MJ: Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 2003;300:339–342.
23. Tschärke DC, and Suhrbier A: From mice to humans—murine intelligence for human CD8₊ T cell vaccine design. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5:263–271.

24. Van Der Most RG, Murali-Krishna K, Ahmed R, and 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;4:8094–8101.
25. Van der Most RG, Murali-Krishna K, and Ahmed R: Prolonged presence of effector-memory CD8 T cells in the central nervous system after dengue virus encephalitis. *Intern Immunol* 2003;15:119–125.
26. Welsh RM, Selin LK, and Szomolanyi-Tsuda E: Immunological memory to viral infection. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:23.1–23.33.
27. Williams MA, Holmes BJ, Sun JC, and Bevan MJ: Developing and maintaining protective CD8_ memory T cells. *Immunol Rev* 2006;211:146–153. 11
28. Wu SF, Liao CL, Lin YL, et al.: Evaluation of protective efficacy and immune mechanism of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 in mice. *Vaccine* 2003;21:3919–3929.