

**Título: Las partículas semejantes a nucleocápsidas, obtenidas a partir de la proteína recombinante de la cápsida de Dengue-2, inducen células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que protegen contra la encefalitis viral en ratones.**

**Autores:** Lázaro Gil<sup>1</sup>, Carlos López<sup>1</sup>, Laura Lazo<sup>1</sup>, Iris Valdés<sup>1</sup>, Ernesto Marcos<sup>1</sup>, Ruby Alonso<sup>2</sup>, Ailyn Gambe<sup>1</sup>, Jorge Martín<sup>1</sup>, Yaremis Romero<sup>1</sup>, María G. Guzmán<sup>3</sup>, Gerardo Guillén<sup>1</sup> and Lisset Hermida<sup>1</sup>

<sup>1</sup> División de Vacunas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave. 31, P.O. Box 6162, Playa, Havana 10 600, Cuba.

<sup>2</sup> Departamento de Inmunoterapia Experimental, Centro de Immunología Molecular. P.O. Box 16 040, Playa, Havana 11 600, Cuba.

<sup>3</sup> Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, Centro Colaborador OMS/OPS para el estudio del Dengue y su vector, Autopista Novia del Mediodía, km 6 ½ P.O. Box Marianao 13, Havana 11 600, Cuba.

**Autor principal:** Lázaro Gil González

División de Vacunas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave. 31, P.O. Box 6162, Playa, Havana 10 600, Cuba.

Teléfono: 53-7-2716022 ext. 7220 Fax: (53-7) 271 4764

Email: lazaro.gil@cigb.edu.cu

### **Abreviaturas:**

APC: alofocianina; FITC: isotiocianato de fluoresceína; TPG: título promedio geométrico; AcM: anticuerpo monoclonal; ufp: unidades formadoras de placa; LD<sub>50</sub>: dosis letal media; SEM: error estándar de la media

### **Introducción**

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más ampliamente difundida que afecta a la población humana. Cada año se informan entre 50 y 100 millones de casos de Fiebre del Dengue, 500 000 de los cuales resultan en la forma más severa de la enfermedad conocida como Fiebre Hemorrágica del Dengue (1). El agente causal de esta enfermedad es el virus dengue (VD), que pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *flavivirus*. Existen cuatro serotipos de este patógeno (VD1, VD2, VD3 y VD4), cuyas secuencias genéticas divergen en un 30% (2).

Durante varios años, los investigadores han propuesto la generación de anticuerpos neutralizantes como una premisa para lograr la protección contra el virus. Sin embargo, el dengue es un virus no citopático, que estimula la expresión de moléculas del MHC-I en la superficie de las células

infectadas (3), por lo tanto, la respuesta inmune mediada por células debe constituir un importante mediador del sistema inmune adaptativo contra este patógeno. Varios estudios señalan el papel patogénico de la respuesta de células T durante la infección secundaria. Como resultado de la infección heteróloga, se activan preferentemente las células T de reactividad cruzada (4), las cuales exhiben un deficiente estado de granulación (5) y una alterada producción de citocinas inflamatorias (6, 7), que contribuyen a la severidad de la enfermedad. Por el contrario, muy poco se conoce acerca del papel protector de las células T contra este patógeno, de ahí que sea necesario profundizar en el estudio acerca de la inmunidad mediada por células (IMC), para una mejor comprensión de la inmunopatología del dengue y la inmunogenicidad de los candidatos vacunales (8).

Aun cuando los candidatos vacunales basados en cepas virales vivas atenuadas, inducen una adecuada respuesta inmune humoral y celular, tienen importantes limitaciones. La más significativa de ellas está dada por la reactogenicidad y el riesgo teórico de potenciar la enfermedad luego de la vacunación y ante una infección natural (9). Además, debido al fenómeno de inmunodominancia y/o de interferencia viral en las formulaciones tetravalentes de estos candidatos, se requieren varias dosis para inducir una respuesta inmune equivalente contra los cuatro serotipos del virus (10, 11). Como alternativa, las vacunas de subunidades recombinantes basadas en proteínas virales, capaces de mimetizar la estructura de la partícula viral y de inducir una adecuada respuesta inmune, constituyen un blanco atractivo. En este escenario, las partículas semejantes a virus (PSV) han mostrado ser candidatos vacunales efectivos con resultados satisfactorios contra diferentes patógenos (12).

Teniendo en cuenta el posible papel protector de la IMC contra VD, hemos focalizado nuestro trabajo en la proteína de la cápsida del VD2. Esta proteína se ha identificado como un blanco de la respuesta antiviral de células T (13). Un estudio previo, desarrollado en nuestro laboratorio, demostró que la fracción semipurificada de la proteína de la cápsida expresada en *Escherichia coli*, induce protección parcial en el modelo de encefalitis viral en ratones sin la inducción de una respuesta inmune humoral funcional (14).

En el presente trabajo, partículas obtenidas a partir de la fracción purificada de la proteína recombinante se evaluaron en ratones con el objetivo de medir la capacidad protectora de la misma, así como la IMC inducida por este antígeno. La inmunización con las partículas semejantes a nucleocápsida (PSNs) adyuvadas en alúmina no generaron una respuesta de anticuerpos contra el virus, mientras que los esplenocitos de los animales inoculados secretaron altos niveles de IFN- $\gamma$  tras la estimulación viral *in vitro*. Además se obtuvo una protección significativa luego del reto intracraneal de los ratones, con una cepa letal de VD2. Finalmente, se demostró que las poblaciones celulares CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> contribuyen tanto a la secreción de la citocina como a la protección.

## Diseño metodológico

### Purificación de la proteína recombinante y ensamblaje *in vitro* de las partículas

La proteína de la cápsida del VD2 se expresó en *E. coli* como previamente describió Lazo y cols., 2007 (14). El proceso de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico, así como el ensamblaje *in vitro* de las partículas de la cápsida se realizó según López y cols., 2009 (15).

### Esquemas de inmunización y ensayos de protección

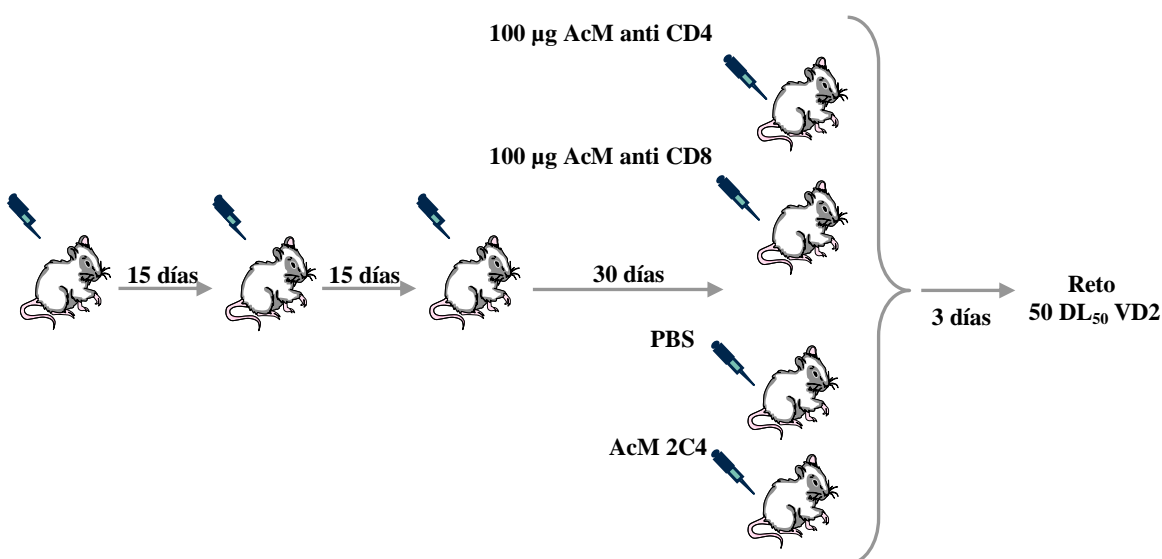
#### Esquema de inmunización No. 1

Grupos de 10 ratones se inocularon por vía intraperitoneal (i.p) con diferentes formulaciones de la proteína recombinante de la cápsida. Se administró tres dosis de cada antígeno los días 0, 15 y 30. Todas las formulaciones tuvieron un volumen de 100  $\mu$ L y se adyuvaron en hidróxido de aluminio (Alhydrogel) (Brenntag Biosector, Denmark) a una concentración final de 1,44 mg/mL. Grupo 1: 10  $\mu$ g de proteína de la cápsida (proteína soluble). Grupo 2: 10  $\mu$ g de PSNs. Grupo 3: 20  $\mu$ g de PSNs. Grupo 4: Placebo (0,25  $\mu$ g de oligonucleótidos por ratón, en tampón de formación de partículas). Grupo 5 (control positivo): Recibió una dosis (0,5 mL) de VD2 infeccioso sin adyuvante. A los ratones se les extrajo sangre y las células del bazo, 30 días después de la última dosis, para medir la respuesta inmune humoral y celular inducida.

#### Esquema de inmunización No. 2

Un segundo esquema de inmunización se diseñó de la siguiente forma:

Grupo 1: 20  $\mu$ g de PSNs. Grupo 2: Placebo (0,25  $\mu$ g de oligonucleótidos por ratón, en tampón de formación de partículas). Grupo 3 (control positivo): Recibió una dosis (0,5 mL) de VD2 infeccioso sin adyuvante. El procedimiento, las formulaciones y la evaluación inmunológica se realizaron como está descrito en el esquema anterior. En este segundo esquema se emplearon un total de 66 animales por grupo (figura 1).



**Figura 1** Diagrama del Segundo esquema de inmunización. Tres grupos de 66 animales cada uno se inmunizaron en los días 0, 15 y 30 con 20 µg de PSNs, Placebo y VD2, respectivamente. Treinta días después de la última dosis se dividieron en cuatro subgrupos que se inocularon por vía i.p con una sola dosis de 100 µg del AcM anti-CD8, 100 µg del AcM anti-CD4, PBS y el AcM 2C4 (control de isotipo), respectivamente. Tres días después, los animales se inocularon por vía intracraneal con 20 µL de una preparación infectiva que contuvo 50 DL<sub>50</sub> (20 pfu) de VD2 NGC.

### **Medición de la respuesta inmune humoral mediante ELISA**

La presencia de anticuerpos anti-cápsida 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 (15). Para la detección de anticuerpos antivirales se empleó el sistema de ELISA de captura, previamente descrito por Gil y cols., 2009 (16).

### **Cultivo de células y estimulación viral**

Las células del bazo se obtuvieron en condiciones asépticas y el cultivo y la estimulación viral, así como la eliminación selectiva de poblaciones celulares in Vitro se realizó según Gil y cols., 2009 (16).

### **Detección de citocinas**

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**

### **Las PSNs inducen una respuesta inmune funcional contra VD2 en ratones**

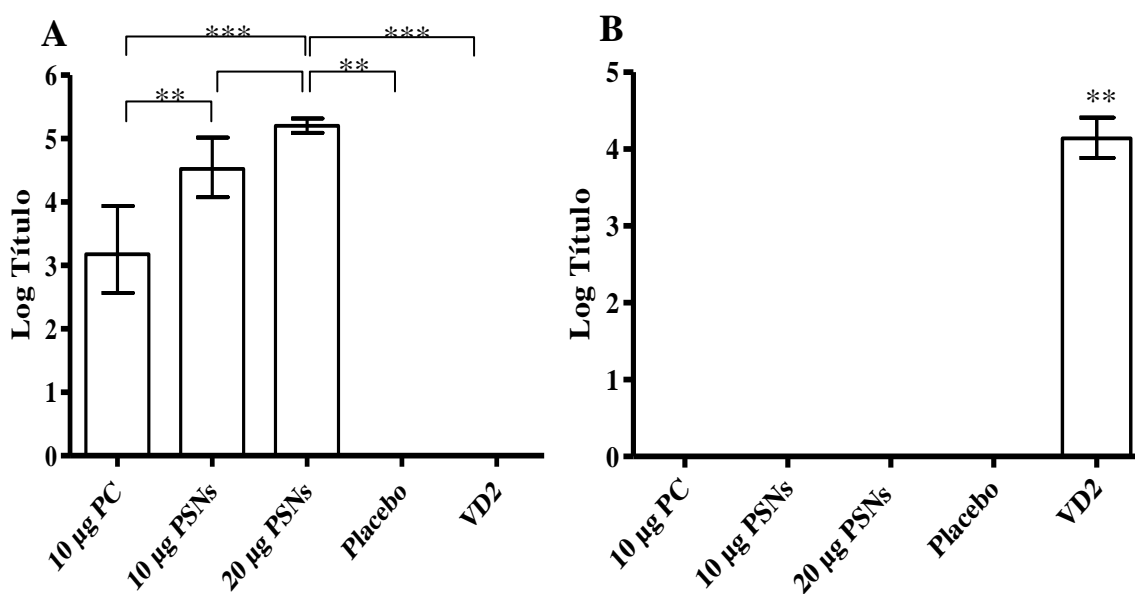
Para evaluar la inmunogenicidad de las PSNs adyuvadas en alúmina se administraron dos dosis (10 y 20 µg) de este antígeno en ratones. Como control un grupo de animales se inmunizó con 10 µg de la proteína de la cápsida formulada en el mismo adyuvante, teniendo en cuenta que dosis mayores de este antígeno no inducen protección tras el reto viral infeccioso (resultados no

publicados). Treinta días después de la tercera dosis se midió la respuesta inmune humoral y celular inducida.

*La respuesta inmune humoral generada por las PSNs no reconoce al VD2, ni neutraliza la infección viral in vitro*

La aparición de anticuerpos reactivos a la proteína recombinante o al VD2 se detectó mediante un sistema de ELISA a través del cual se determinaron los títulos por dilución a punto final de los sueros obtenidos 30 días tras la tercera dosis (Figura 2). Como resultado, todos los animales inmunizados con las formulaciones de las PSNs desarrollaron una respuesta inmune humoral contra la proteína de la cápsida significativa, aunque se observó diferencias estadísticamente significativas entre las dos dosis empleadas ( $p < 0,01$ ) (Figura 2A). Por otro lado, los títulos de anticuerpos medidos en el grupo de animales inmunizados con la proteína de la cápsida fueron significativamente menores que los obtenidos en los grupos inmunizados con las PSNs. Ninguno de los sueros de los animales inmunizados con la preparación de VD2 infectiva reconocieron la proteína recombinante. En concordancia solo se detectó anticuerpos antivirales en el suero de los animales inmunizados con el virus (Figura 2B).

Para corroborar la falta de funcionalidad de la respuesta inmune humoral, se realizó un ensayo de neutralización viral por reducción del número de placas virales (PRNT) (17). Como resultado, ninguno de los suero proveniente de los animales inmunizados con formulaciones de la proteína de la cápsida mostraron actividad neutralizante ( $TPG < 10$ ). La no exposición de regiones de esta proteína en la superficie del virión maduro (18, 19), puede conllevar a que las células B no interactúen con la misma durante la infección. Además, la inoculación intraperitoneal de VD en ratones induce una viremia de corta duración, la cual es controlada rápidamente por el sistema inmune innato (20).

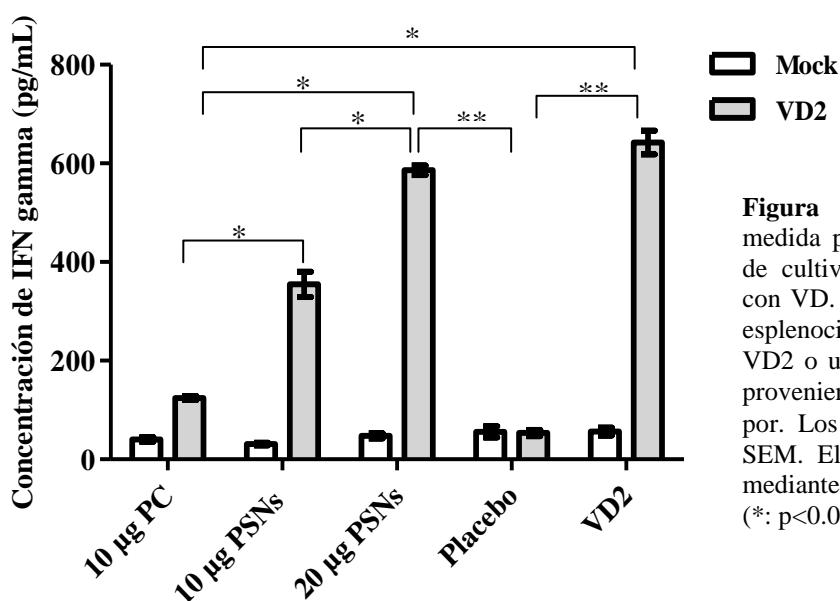


**Figura 2:** Respuesta inmune humoral generada por la inoculación de diferentes formulaciones de la proteína recombinante de la cápsida del VD2. Los títulos de anticuerpos IgG se midieron por ELISA. (A) Anticuerpos anti-cápsida. (B) Anticuerpos antivirales. Para ambos casos, los datos representan la media geométrica con el 95% del intervalo de confianza. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de clasificación simple, usando la prueba SNK (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

### La inmunización con las PSNs genera una respuesta inmune mediada por células

Para evaluar la IMC, se extrajeron las células del bazo de los animales inmunizados, 30 días después de la última dosis, y midió la secreción de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos, luego de la estimulación con una preparación de VD2 infeccioso. Las células del bazo de los animales inmunizados con 10 y 20  $\mu\text{g}$  de las PSNs secretaron altos niveles de la citocina ( $354,8 \pm 44,4$  pg/mL y  $586,2 \pm 16,6$  pg/mL, respectivamente) (Figura 3). Interesantemente los animales inmunes a VD2, desarrollaron una respuesta similar a la observada para el grupo que se inoculó con la mayor dosis ( $642,2 \pm 41,3$  pg/mL). Por el contrario, para el caso de los inmunizados con 10  $\mu\text{g}$  de la proteína de la cápsida se observó una baja secreción de IFN- $\gamma$  ( $124,1 \pm 7,1$  pg/mL), sin diferencias estadísticas con respecto al grupo placebo ( $53,5 \pm 10,7$  pg/mL). Esta citocina se ha descrito como un mediador de la respuesta celular a través de su actividad antiviral contra VD, e incluso se ha encontrado una relación entre la actividad CD4 y CD8 citotóxica y la secreción de la misma (21). Adicionalmente, los niveles de secreción de IFN- $\gamma$  dependieron de la naturaleza del antígeno, determinada por la cantidad de ODNs empleada en el proceso de formación de las partículas. Esto último podría deberse a que los antígenos en forma de partículas son más eficientemente presentados por vía MHC-I (presentación cruzada), que los antígenos solubles (22). De hecho, las PSV pueden inducir la maduración de las células dendríticas y la secreción de citocinas que estimulan células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (23). La elevada inmunogenicidad descrita para otras PSV, puede explicar los niveles de secreción de IFN- $\gamma$  observados en este trabajo para los animales inmunizados con las PSNs, los cuales fueron similares a los medidos para los ratones inmunes a VD2.

Por otro lado, la presencia de ODNs en las PSNs podría potenciar la respuesta inmune generada por las mismas. Diversos estudios han descrito a los ODNs como adyuvantes capaces de potenciar la inmunidad mediada por células frente a antígenos blanco (24).



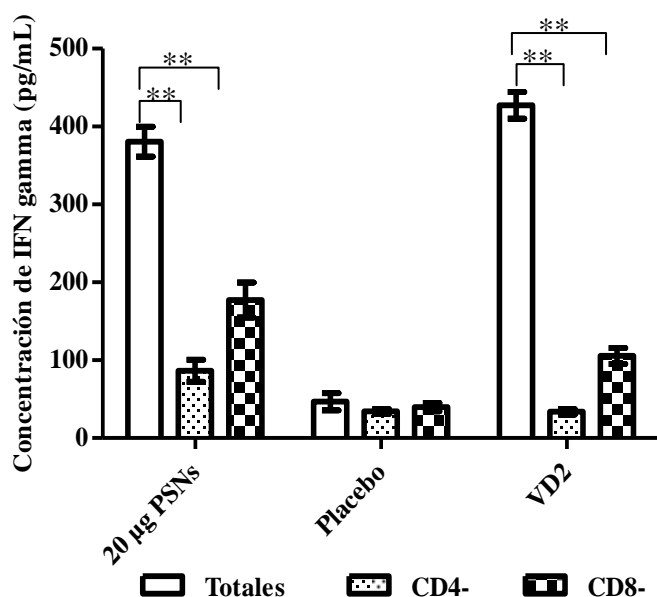
**Figura 3:** Concentración de IFN- $\gamma$  medida por ELISA, en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con VD. El sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con  $10^3$  ufp de VD2 o una preparación control (mock), proveniente de cada animal se chequeó por. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney (\*: p<0.05; \*\*: p<0.01).

## La IMC generada por las PSNs juega un papel crucial en la protección contra VD2

Teniendo en cuenta los resultados descritos, se seleccionó la formulación de 20 µg de PSNs para un Segundo experimento en ratones con el objetivo de caracterizar la respuesta inmune celular y su posible relación con la protección ante el reto con VD2.

*La inmunización con las PSNs genera células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN-γ in vitro tras la estimulación viral*

En el primer estudio nosotros medimos una alta secreción de IFN-γ *in vitro* a partir de los esplenocitos de los animales inmunizados con la formulación de 20 µg de PSNs. Luego, en este segundo experimento determinamos la contribución de las poblaciones celulares CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a la secreción de esta citocina. Como se muestra en la figura 4, y en correspondencia con el primer estudio las células del bazo de los animales inmunizados con las PSNs secretan altas concentraciones de IFN-γ, estadísticamente similar a la secretada por los esplenocitos de los animales inmune a VD2. Sin embargo, la eliminación de ambas poblaciones celulares afectó significativamente la secreción de la citocina ( $p < 0,001$ ) con respecto a los niveles detectados en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos totales. Similar comportamiento se observó para el caso de los animales inmunes a VD2 (Figura 4).

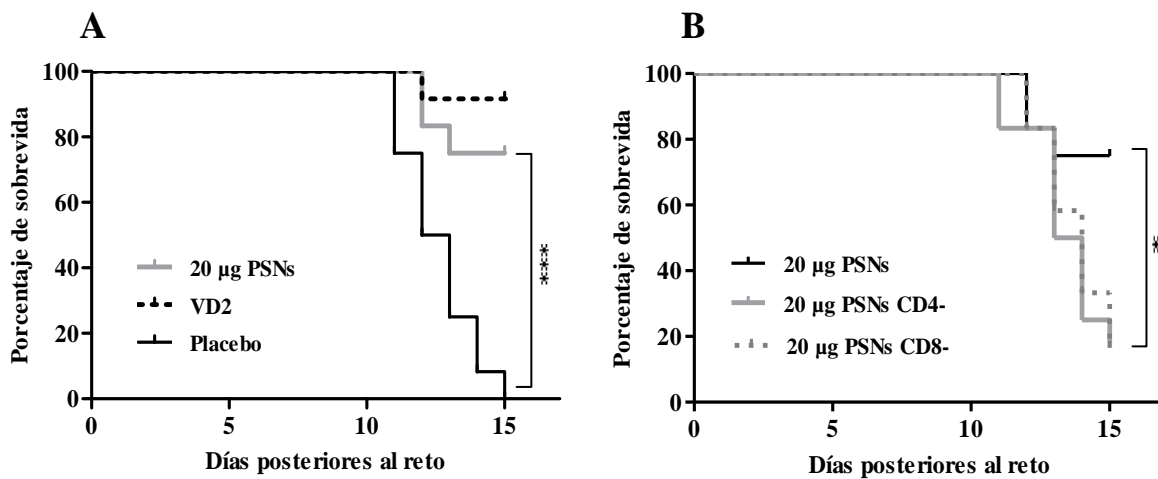


**Figura 4:** Concentración de IFN-γ medida por ELISA, en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos estimulados con VD. Esplenocitos totales y deficientes de células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> se estimularon con 10<sup>3</sup> ufp de VD2. Los datos representan la media ± SEM. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de calificación doble con la prueba de Bonferroni (\*\*\*:  $p < 0.001$ ).

*Las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, específicas para las PSNs, protegen contra encefalitis viral por dengue*

Paralelamente se estudió el efecto de la eliminación selectiva *in vivo* de las poblaciones celulares CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en la protección contra VD. Un mes después de la última dosis un subgrupo de animales inmunizados con las PSNs o VD2 se inocularon con AcM capaces de eliminar las células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, y tres días más tarde se retaron con una cepa letal neurovirulenta de VD2.

Al final del período de observación el 78% de los animales inoculados con las PSNs controlaron la encefalitis viral y permanecieron vivos, mientras que todos los animales del grupo placebo murieron (Figura 5A). Por su parte, el grupo control positivo inmunizado con VD2, mostró un 100% de protección en concordancia con estudios previos (16, 14, 25). Por otro lado, la eliminación previa al reto de las poblaciones celulares CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, conllevó a la muerte de más de un 80% de los animales inmunizados con las PSNs, sin mostrar diferencias estadísticas con respecto al grupo control negativo (Figura 5B). Además, de forma similar a un estudio previo, solo la eliminación de las células CD8<sup>+</sup> afectaron la sobrevida de los animales inmunizados con VD2 (16). La sobrevida de los animales no se afectó por la administración del AcM 2C4, empleado como control de isotipo (datos no mostrados). Adicionalmente, el comportamiento de la mortalidad de los ratones del grupo placebo no se afectó por la eliminación de las poblaciones CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (datos no mostrados).



**Figure 5:** Porcentaje de sobrevida de ratones inmunizados tras el reto con 50 DL<sub>50</sub> de VD2. (A) Curvas de sobrevida de los animales de cada grupo. (B) Curvas de sobrevida de animales inmunizados con las PSNs deficientes de células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. (N=12). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de log-rank (\*: p<0.05; \*\*\*: p<0.001).

Aun sin inducirse una respuesta inmune humoral funcional, un alto porcentaje de sobrevida se alcanzó para el grupo inmunizado con las PSNs, el cual dependió de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, pues la eliminación previa al reto de estas células comprometió la vida de los animales. Este resultado es consistente con los experimentos *in vitro*. Varios estudios previos han demostrado la relación entre la actividad CD8 citotóxica y la secreción de IFN-γ (5, 26, 27). Por otro lado, las células T CD4<sup>+</sup> pueden estar directamente involucradas en la protección contra la enfermedad, dado que estas células pueden mediar la lisis *in vitro* de células infectadas, por *flavivirus* (28), incluyendo VD (13, 26, 29, 30).

Estos hallazgos experimentales sugieren un potencial papel protector para la IMC contra VD en el modelo de encefalitis viral en ratones, en concordancia con estudios previamente publicados (16, 31, 32). Además, en estudios realizados con individuos inmunes al virus y con voluntarios



inmunizados con candidatos vacunales atenuados, se ha demostrado la existencia de clones de células T, con actividad antiviral *in vitro* (27, 33-35).

Similar a lo reportado para la respuesta inmune humoral, un papel patogénico se ha descrito para la IMC en las infecciones naturales con un serotipo heterólogo. Varios estudios señalan que la respuesta de células T memoria de reactividad cruzada pueden también estar involucradas en una respuesta inmune inadecuada (2, 4, 5, 36). Como consecuencia, un futuro candidato vacunal debe incluir la mezcla de las proteínas recombinantes correspondientes a los cuatro serotipos del dengue.

Nuestros resultados proveen nuevas evidencias del papel protector de la inmunidad medida por células en ratones, sin la contribución de la respuesta inmune humoral funcional. No obstante, las limitaciones asociadas al modelo de encefalitis viral, impone la necesidad de realizar futuros estudios en primates no humanos o ratones humanizados con el objetivo de definir la utilidad de las PSNs como posible candidato vacunal contra la enfermedad del dengue.

## Referencias bibliográficas

1. Gubler, D. J. and Kuno, G. 1997. Viral pathogenesis of dengue infections. In: Gubler, D. J. and Kuno, G., eds., *Dengue and dengue hemorrhagic fever*, p. 273. Wallingford England: CAB International.
2. Beaumier, C. M., Mathew, A., Bashyam, H. S. and Rothman, A. L. 2008. Cross-reactive memory CD8+ T cells alter the immune response to heterologous secondary dengue virus infections in mice in a sequence-specific manner. *J. Infect. Dis.* 197: 608.
3. Lobigs, M., Mullbacher, A. and Lee, E. 2004. Evidence that a mechanism for efficient flavivirus budding upregulates MHC class I. *Immunol. Cell Biol.* 82: 184.
4. Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X. N., Vasanawathana, S., Tangthawornchaikul, N., Chairunsri, A., Sawasdivorn, S., Duangchinda, T., Dong, T., Rowland-Jones, S., Yenchitsomanus, P. T., McMichael, A., Malasit, P. and Screaton, G. 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat. Med.* 9: 921.
5. Mongkolsapaya, J., Duangchinda, T., Dejnirattisai, W., Vasanawathana, S., Avirutnan, P., Jairungsri, A., Khemnu, N., Tangthawornchaikul, N., Chotiyarnwong, P., Sae-Lang, K., Koch, M., Jones, Y., McMichael, A., Xu, X., Malasit, P. and Screaton, G. 2006. T cell response in Dengue Hemorrhagic Fever: Are cross-reactive T cells suboptimal? *J. Immunol.* 176: 3821.
6. Mangada, M. M. and Rothman, A. L. 2005. Altered cytokine response of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J. Immunol.* 175: 2676.
7. Imrie, A., Meeks, J., Gurary, A., Sukhbataar, M., Kitsutani, P., Effler, P. and Zhao, Z. 2007. Differential functional avidity of dengue virus-specific T-cell clones for variant peptides representing heterologous and previously encountered serotypes. *J. Virol.* 81: 10081.
8. Thomas, S. J., Hombach, J. and Barrett, A. 2009. Scientific consultation on cell mediated immunity (CMI) in dengue and dengue vaccine development. *Vaccine* 27: 355.
9. Vaughn, D. W., Scherer, J. M. and Sun, W. 2008. Resistance to Infection. In: Halstead, S. B. ed., *Dengue*, p. 123. Tropical Medicine: Science and Practice.
10. Sabchareon, A., Lang, J., Chanthavanich, P., Yoksan, S., Forrat, R., Attanath, P., Sirivichayakul, C., Pengsaa, K., Pojjaroen-Anant, C., Chambonneau, L., Saluzzo, J. F. and Bhamarapravati, N. 2004. Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23: 99.
11. Simasathien, S., Thomas, S. J., Watanaveeradej, V., Nisalak, A., Barberousse, C., Innis, B. L., Sun, W., Putnak, J. R., Eckels, K. H., Hutagalung, Y., Gibbons, R. V., Zhang, C., de la Barrera, R., Jarman, R. G., Chawachalalai, W. and Mammen M. P. 2008. Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus naive children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78: 426.

12. Noad, R. and Roy, P. 2003. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11: 438.
13. Gagnon, S. J., Zeng, W., Kurane, I. and Ennis, F. A. 1996. Identification of two epitopes on the dengue 4 virus capsid protein recognized by a serotype-specific and a panel of serotype-cross-reactive human CD4+ cytotoxic T-lymphocytes clones. *J. Virol.* 70: 141.
14. Lazo, L., Hermida, L., Zulueta, A., Sánchez, J., López, C., Silva, R., Guillén, G. and Guzmán M. G. 2007. A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine* 25: 1064.
15. López, C., Gil, L., Lazo, L., Menéndez, I., Marcos, E., Sánchez, J., Valdés, I., Falcón, V., de la Rosa M. C., Márquez, G., Guillén, G. and Hermida, L. 2009. The in vitro assembly of nucleocapsid-like particles from the purified recombinant capsid protein of dengue 2. *Arch Virol.* 154: 695.
16. Gil, L., López, C., Blanco, A., Lazo, L., Martín, J., Valdés, I., Romero, Y., Figueroa, Y., Guillén, G. and Hermida, L. 2009. The cellular immune response plays an important role in protecting against dengue virus in the mouse encephalitis model. *Viral Immunol.* 22: 23.
17. Morens, D. M., Halstead, S. B. and Repik, P. M. 1985. 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.* 22: 250.
18. Kuhn, R. Y., Zhang, W., Rossman, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S. and Strauss, J. H. 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108: 717.
19. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J. and Rossmann, M. G. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 13.
20. Brinton, M. A. and Perelygin, A. A. 2003. Genetic resistance to flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 60: 43.
21. Shresta, S., Kyle, J. L., Snider, H. M., Basavapatna, M., Beatty, P. R. and Harris, E. 2004. 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.* 78: 2701.
22. Ackerman, A. L., Giodini, A. and Cresswell, P. 2006. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25: 607.
23. Chung, Y. C., Ho, M. S., Wu, J. C., Chen, W. J., Huang, J. H., Chou, S. T. and Hu, Y. C. 2008. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. *Vaccine* 26: 1855.
24. Vollmer, J. 2006. CpG motifs to modulate innate and adaptative immune response. *Int. Rev. Immunol.* 25: 125.
25. Schlesinger, J. J., Brandis, M. W. and Walsh, E. E. 1987. Protection of mice against dengue-2 encephalitis by immunization with dengue-2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J. Gen. Virol.* 68: 853.
26. Gagnon, S. J., Ennis, F. A. and Rothman, A. L. 1999. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4+ cytotoxic T-lymphocytes clones. *J. Virol.* 73: 3623.
27. Van der Most, R. G., Murali-Krishna, K. and Ahmed, R. 2003. Prolonged presence of effector-memory CD8 T cells in the central nervous system after dengue virus encephalitis. *Intern. Immunol.* 15: 119.
28. Aihara, H., Takasaki, T., Matsutani, T., Suzuki, R. and Kurane, I. 1998. Establishment and characterization of japanese encephalitis virus-specific human CD4 T-cell clones: flavivirus cross-reactivity, protein recognition, and cytotoxic activity. *J. Virol.* 72: 8032.
29. Green, S., Kurane, I., Eldelman, R., Tacket, C. O., Eckels, K. H., Vaughn, D. W., Hoke, C. H. and Ennis, F. A. 1993. Dengue virus-specific human CD4+ T-lymphocyte responses in a recipient of an experimental live-attenuated dengue virus type 1 vaccine: bulk culture proliferation, clonal analysis and precursor frequency determination. *J. Virol.* 67: 5962.
30. Berrios, V., Kurane, I. and Ennis, F. A. 1996. Immunomodulatory effects of IL-7 on dengue virus-specific cytotoxic CD4+ T cell clones. *Immunol. Invest.* 25: 231.
31. Van der Most, R. G., Murali-Krishna, K., Ahmed, R. and Strauss, J. H. 2000. Chimeric yellow fever/ dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J. Virol.* 4: 8094.
32. Yauch, L. E., Zellweger, R. M., Kotturi, M. F., Qutubuddin, A., Sidney, J., Peters, B., Prestwood, T. R., Sette, A. and Shresta, S. 2009. A protective role for dengue virus-specific CD8+ T cells. *J. Immunol.* 182: 4865.

33. Dharakul, T., Bhamarapavati, N., Yoksan, S., Vaughn, D. W., Hoke, C. H. and Ennis, F. A. 1994. Dengue virus-specific memory T cell responses in human volunteers receiving a live-attenuated dengue virus type 2 candidate vaccine. *J. Infect. Dis.* 170: 27.
34. Rothman, A. L., Kanesa-thasan, N., West, K., Saluzzo, J. F. and Ennis, F. A. 2001. Induction of lymphocyte responses to dengue virus by a candidate tetravalent live attenuated dengue vaccine. *Vaccine* 19: 4695.
35. Sabchareon, A., Lang, J., Chanthavanich, P., Yoksan, S., Forrat, R., Attanath, P., Sirivichayakul, C., Pengsaa, K., Pojjaroen-Anant, C., Chokejindachai, W., Jagsudee, A., Saluzzo, J. F. and Bhamarapavati, N. 2002. Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccine in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio and multiple doses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 264.
36. Zivny, J., DeFronzo, M., Jarry, W., Jameson, J., Cruz, J., Ennis, F. A. and Rothman, A. L. 1999. Partial agonist effect influences the CTL response to a heterologous dengue virus serotype. *J. Immunol.* 163: 2754.