

Tecnologias de vacinas para dengue

Patricia Sousa dos Santos Moreira

Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia

patimoreira@live.com

RESUMO

A dengue é uma doença infecciosa, altamente endêmica dos países tropicais e subtropicais. É causada por um arbovírus, pertencente ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviridae*, transmitido por mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*. A infecção viral por dengue tornou-se um problema de saúde global crescente, principalmente devido a extensão do alcance geográfico do vírus, devido à globalização, à urbanização e ao crescimento demográfico desordenado. Por isso, o desenvolvimento de uma vacina eficaz torna-se urgente. Existem várias estratégias para tal, dentre elas: vacina de vírus atenuado, quiméricas, vetorizadas e de subunidade, e todas elas visam induzir resposta imune de longa duração para os quatro sorotipos, sem que cause nenhum efeito adverso, como o aumento das chances de evoluir para formas mais graves da doença. Esta revisão visa descrever as atuais tecnologias envolvidas na produção de vacinas em desenvolvimento contra dengue.

Palavra-chave: dengue, flavivírus, desenvolvimento de vacina

ABSTRACT

Dengue is an infectious disease, endemic to tropical and subtropical countries, caused by an arbovirus belonging to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviridae*, transmitted by female mosquitoes of the genus *Aedes*. Dengue viral infection has become a growing global health problem, mainly due to the extension of the geographical scope of the virus due to globalization, urbanization and disorderly population growth. Therefore, the development of an effective vaccine becomes urgent. There are several strategies for the development of a dengue vaccine, among them: attenuated virus, chimeric, vectored and subunit virus, all of which aim to induce a long-lasting immune response to the four serotypes, without causing any adverse effects, such as increased chances of progressing to more severe forms of the disease. This review describes the current technologies involved in the production of vaccines under development for dengue.

Keywords: dengue, flavivirus, vaccine development

INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença tropical infecciosa causada por vírus. Ela é transmitida a seres humanos por picadas de mosquitos e tem grande importância para a saúde pública. O número de casos de dengue notificados anualmente à Organização Mundial de Saúde – OMS aumentou de 0,4 para 1,3 milhões de 1996 a 2005, chegando a 2,2 milhões em 2010 e 3,2 milhões em 2015 (WHO, 2016).

O vírus da dengue (DENV), um flavivírus da família *Flaviridae*, é um vírus de RNA fita simples de cadeia positiva, transmitido pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes spp.* (tendo como

principais vetores os das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*), e possui quatro sorotipos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4). A infecção pelo vírus causa a febre por dengue, dengue com sinais de agravo e dengue grave (BRASIL, 2016).

A dengue ocorre mediante infecção com qualquer um dos sorotipos, podendo ser assintomática ou causar sintomas como febre branda, cefaleia, mialgia, dor nos olhos e/ou erupções cutâneas, com duração de 7 a 10 dias. Seu tratamento é feito com bastante repouso e ingestão de líquidos, além de controle de dor e febre através de medicamentos antipiréticos ou analgésicos (HEILMAN et al., 2014). A resposta imune

para a dengue é homotípica, ou seja, oferece proteção àquele sorotipo específico ao qual o indivíduo fora exposto, não oferecendo proteção cruzada. Dessa forma, o indivíduo pode sofrer até mais três infecções por sorotipos diferentes (HALSTEAD, 2009).

Além da influência da cepa viral, predisposição genética e o estado imunitário anterior à infecção (GUY, 2008), as formas graves podem também acontecer pelas respostas imune inapropriadas, tanto celular quanto humoral; a nível celular, quando há a produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios solúveis e ativação do complemento pelas células T de baixa afinidade e a nível humoral quando ocorre o aumento da replicação viral numa segunda infecção por outro sorotipo que se dá, provavelmente, por anticorpos da infecção prévia, que se ligam aos receptores Fc dos anticorpos, chamados de não neutralizantes, fenômeno este conhecido como *Antibody Dependent Enhancement* – ADE, em inglês, ou Reforço Dependente de Anticorpo, o qual favorece a manifestação de formas mais graves da doença (KLIKIS et al., 1989).

A ineficácia do controle do vetor, as mudanças demográficas e sociais, o aumento das viagens aéreas, a falta de infraestrutura de saneamento básico, mudanças das cepas virais e a co-circulação de vários sorotipos, aumentam as chances de dengue hemorrágica (COSTA et al., 2002; GUBLER, 2011).

Os estudos para produção de vacinas para dengue tiveram início na década de 1920, pela atenuação do vírus através do sangue ou da moagem de *Aedes spp.* infectados (SIMMONS, 1931). Em 1952, Sabin e Schlesinger, desenvolveram uma cepa atenuada de DENV1 que foi protetora em 16 voluntários submetidos à picada do mosquito vetor. Com os adventos da cultura de células e tecidos, bem como da engenharia genética através da tecnologia do DNA recombinante, é possível então desenvolver uma vacina contra dengue com maior eficácia e segurança para a sociedade.

METODOLOGIA

Para a revisão bibliográfica, a busca foi realizada no NCBI – PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e foram selecionados artigos publicados até

2016, escritos em inglês ou português. A busca foi feita utilizando principalmente os seguintes termos: vaccine technology, dengue vaccine, development of dengue vaccine, dengue vector, technologies of development for dengue vaccine, entre outros, para que houvesse maior recuperação de referências e detecção da maioria dos trabalhos publicados dentro dos critérios.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existe apenas uma vacina disponível comercialmente para o vírus da dengue, produzida pela Sanofi-Pasteur, com eficácia de proteção contra dengue mensurada de 64,7% quando testada em uma população de 20.869 crianças entre 9 e 16 anos (VILLAR et al., 2015). Devido ao número de casos de dengue – 390 milhões de infecções estimadas globalmente por ano, das quais 96 milhões sejam com manifestações clinicamente aparentes (BHATT, 2013), e ao potencial comercial desse mercado, outras empresas estão também na busca por outras vacinas que sejam seguras, efetivas para todos os sorotipos e acessível. As vacinas têm as mais diferentes abordagens, sendo elas: vírus vivos atenuados, vírus inativados, vacinas subunitárias, vacinas de DNA e vírus quiméricos usando vacina contra a febre amarela e vírus da dengue atenuados como esqueleto (BECKETT; TJADEN; BURGESS, 2011; BHAMARAPRAVATI, 2000; COLLIER; CLEMENTS, 2011; DIAMOND; PIERSON, 2015; MURRELL; WU; BUTLER, 2011; RUPP, 2015).

A vacina produzida pela Sanofi-Pasteur baseia-se na produção de quatro vírus quiméricos vivos da dengue nos quais as sequências da vacina da febre amarela (YF) 17D que codificam as proteínas dos envelopes prM e E foram substituídas pelos genes prM e E do vírus da Dengue dos sorotipos 1, 2, 3 ou 4 num clone molecular de YF-17D. Esta vacina foi produzida e testada usando quatro isolados de vírus da dengue da Indonésia e Tailândia. Verificou-se que esta vacina candidata era atenuada e estável em modelos animais em relação ao tamanho da placa e ao neurotropismo do vírus da febre amarela.

Os resultados dos ensaios clínicos não mostraram efeitos adversos, exceto dor branda no local da injeção, cefaleia e mialgia. O

estudo de fase I da vacina nas Filipinas mostrou que a soro positividade aumentou gradualmente (53, 72 e 92%) após 1-3 vacinações contra os quatro sorotipos em comparação com o grupo controle. Os resultados mais promissores foram observados em crianças de 2-5 anos de idade que apresentaram altos níveis de reatividade de 91, 100, 96, 100% para DENV 1-4, respectivamente, após 3 doses (CAPEDING et al., 2011).

Outro ensaio controlado com placebo foi conduzido em 10.275 crianças do Vietnã (grupo vacinal com 6851 indivíduos, grupo placebo com 3424) para determinar a eficácia clínica e a segurança do CYD-TDV. Os resultados demonstraram casos virológicamente confirmados em 47% do grupo vacinal em comparação com o grupo controle (53%), depois de 3 doses, sendo que a eficácia foi alcançada em até 56,5% (IC 95%: 43,8-66,4) (HUU et al., 2012). Esses achados indicaram que a vacina é altamente eficaz com bom perfil de segurança quando três injeções foram administradas em crianças com idade entre 2-14 anos aos intervalos de 0, 6 e 12 meses.

Em outro estudo, na Índia, a vacina não apresentou eventos adversos graves e a imunogenicidade e a segurança do CYD-TDV foram satisfatórias (CAPEDING et al., 2014). Em um estudo piloto realizado em cinco países latino-americanos onde mais de 20.000 crianças entre 9 e 16 anos foram recrutadas para receber a vacina CYD-TDV, os resultados no que cerne à eficácia (60,8%) e aos perfis de segurança foram consistentes com os achados prévios. Curiosamente, a eficácia da vacina (80,3%) contra a hospitalização por dengue foi promissora e representou um passo adiante no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a dengue (VILLAR et al., 2015).

O Walter Reed Army Institute for Research baseou-se na ideia de vacina de vírus vivo atenuado usando mutantes naturais ou químicos e clonando-os em cultura de células diploides de pulmão de macaco rhesus (FRhL-2). A atenuação do DENV foi desenvolvida através de passagens seriadas dos vírus em células de rim de cão primário (*primary dog kidney* – PDK, em inglês), isentas de agentes infecciosos humanos e

caninos. Sob esta circunstância, espera-se que o número de vírus patogênicos seja reduzido, enquanto o número de vírus atenuados, não patogênico, seria aumentado.

O grau de atenuação que é considerado biologicamente seguro para os seres humanos, mas ainda pode produzir anticorpos neutralizantes (*neutralizing antibodies* – NT, em inglês), pode ser estimado empiricamente com base em certos marcadores biológicos. Seguindo este princípio, as vacinas DEN 1-4 vivas atenuadas foram desenvolvidas a partir de 1981, começando com vacinas monovalentes de todos os quatro tipos. Em seguida, misturadas em vacinas bivalentes, trivalentes e tetravalentes. As vacinas foram recomendadas para serem submetidas a ensaios em humanos por um comitê de direção científico nomeado pela OMS. Na fase 2 desse estudo, realizado com 86 adultos (18 a 45 anos), foram administradas 3 doses da vacina. A resposta de anticorpo tetravalente após a segunda dose em indivíduos não infectados com DENV foi de 60-66,7% e na terceira dose (5-12 meses após a segunda dose) não teve aumento das respostas de anticorpos tetravalentes (THOMAS et al., 2013). A formulação da vacina, apesar de ter apresentado boa imunogenicidade e proteção ao vírus, deve continuar sendo avaliada, agora num espectro maior de participantes.

Outra vacina candidata contra a dengue está em desenvolvimento nos Estados Unidos pela Universidade Johns Hopkins e pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases* – NIAID). Consiste em quatro vacinas utilizando vírus vivo atenuado (DENV1-4), cada uma contendo 30 nucleotídeos de deleção da região 3'-não traduzida do RNA genômico, região denominada delta-30 ($\Delta 30$), dando então, inicialmente, o nome de DENV/ $\Delta 30$ à vacina. Estas vacinas eficientemente prejudicaram o crescimento viral em células de carcinoma hepático humano. Para melhorar a atenuação de DENV-2/ $\Delta 30$ e DENV-3/ $\Delta 30$, o DENV quimérico foi desenvolvido por substituição da região do gene prM-E do vírus DENV-4/ $\Delta 30$ com os genes prM-E de DENV-2 e DENV-3. Os resultados do ensaio clínico de

fase I mostraram que todos os quatro DENV/ Δ 30 vivos atenuados são seguros e imunogênicos com efeitos colaterais menores, tais como erupção cutânea leve e leucopenia transitória apenas após uma dose mais elevada (DURBIN et al., 2005).

Uma vacina a base de DNA “nu” contra DENV foi desenvolvida pelo Naval Medical Research Center. Os genes que codificam as regiões prM e E (pré membrana e envelope, respectivamente) de DENV foram clonados num shuttle vector (vetor que pode se propagar em duas espécies diferentes, por exemplo, em *E. coli* e em mamíferos) sob o controle transcricional do promotor de citomegalovírus humano (CMV). Os resultados da fase I dos ensaios clínicos não mostraram efeitos adversos, exceto dor branda no local da injeção, inchaço e fadiga. Após a segunda dose, observou-se uma forte resposta de anticorpos IgM e IgG, o que favorece o perfil de proteção desta vacina. Para obter um melhor perfil de imunogenicidade, foi desenvolvida uma vacina baseada em adjuvante lipídico Vaxfectin (Vical Incorporated, San Diego, EUA) e os resultados demonstraram um bom perfil de proteção contra o DENV em comparação com o DNA sozinho (BECKETT; TJADEN; BURGESS, 2011). Com base nessa tecnologia, diferentes grupos desenvolveram outras vacinas candidatas e obtiveram boa proteção em modelos de camundongos usando as glicoproteínas de envelope prM e E, a proteína não estrutural NS1 e a helicase/protease NS3 como antígenos de vacina.

A primeira vacina de vírus inativado purificada (PIV – *purified inactivated virus*, em inglês) foi desenvolvida com o hidróxido de alumínio como adjuvante e testada em camundongos e macacos rhesus pelo Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) contra um único sorotipo (DEN-2) e apresentou boa proteção após duas doses (PUTNAK et al., 1996). Para isso, foi isolado o DEN-2 virus (strain S16803), adaptado para células Vero, purificado em sacarose, inativado com formalina e então testado em camundongos para observar a imunização e proteção. Essa vacina contém o capsídeo viral, antígenos prM (pré-membrana) e E (envelope) e pequenas quantidades de NS1

(proteína não estrutural). Num outro estudo, Putnak utilizou da mesma tecnologia, porém para os quatro sorotipos. Além disso, verificaram que a adição de NS3 helicase recombinante pode aumentar o número de anticorpos específicos e de anticorpos neutralizantes, ou seja, pode melhorar sinergicamente a resposta imune, se essa proteína recombinante for adicionada à vacina (SIMMONS, 2016). Apesar de vacinas de vírus inativado purificada ser altamente imunogênica, ela não induz boa resposta imune mediada por células e nem proteção a longo prazo (SIMMONS, 2016).

O Centro para Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* – CDC, USA) está desenvolvendo uma vacina monovalente para os 4 sorotipos de vírus vivo atenuado chamada DENVax. Todas as quatro vacinas são baseadas no esqueleto comum do vírus da dengue: uma cepa de vírus DEN-2 atenuada, denominada PDK-53, gerada por 53 passagens em série em células de rim de cão primário (primary dog kidney – PDK, em inglês) (OSORIO et al., 2011). Essa vacina mostrou ser altamente imunogênica em crianças e adultos e está em fase de ensaio clínico nos Estados Unidos. Com base nisso, Huang et al. (2013) produziu uma vacina tetravalente utilizando o vírus quimérico DENV2 PDK53 como base, substituindo as regiões gênicas prM e E do DENV2 pelo DENV1, 3 e 4. Todas as formulações testadas foram imunogênicas, geraram anticorpos neutralizantes para os quatro sorotipos, em ratos AG129 (HUANG et al., 2013).

Agora denominada TDV (Vacina Tetravalente para Dengue, em inglês), foi administrada em duas doses com intervalo de 90 dias, em ensaio de fase 1, realizado com 72 adultos saudáveis, para avaliar a segurança da vacina, a viremia do componente vacinal e o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes para os quatro sorotipos. Observaram-se baixos níveis de TDV-2, TDV-3 e TDV-4 viremia após a primeira, mas não após a segunda administração. As taxas de soro conversão global e os títulos de neutralização após 2 doses foram 84,2% e 54,1%, respectivamente, para DENV-1; 92,1% e 292,8, respectivamente, para DENV-2; 86,8% e 32,3, respectivamente, para DENV-3; E

71,1% e 15,0, respectivamente, para DENV-4. Mais de 90,0% dos participantes tiveram boa resposta trivalente após a segunda dose (GEORGE et al., 2015). Os resultados mostram que a vacina induziu anticorpos neutralizantes trivalentes para o DENV na maioria dos vacinados, porém precisam ser realizados outros estudos, que inclua um maior número de participantes e diferentes faixa etária.

As vacinas baseadas em subunidades recombinantes podem oferecer vantagens com relação a outros métodos pela ausência de vírus em replicação e/ou nenhuma possibilidade de atenuação, reversão ou inativação inadequada. Clements et al. (2010) descreve a expressão da subunidade 80E de todos os sorotipos de DENV em células *Drosophila* S2. Estas são capazes de expressar níveis elevados de proteína DENV E truncada – sem as extremidades – (80E) na sua conformação nativa. As formulações tetravalentes de subunidades 80E (com ou sem NS1 recombinante) foram avaliadas como possíveis vacinas candidatas em camundongos e NHP (primata não humano, em inglês). Foi obtida uma resposta imunitária equilibrada e a proteção foi demonstrada num pequeno ensaio em NHP quando as formulações tetravalentes foram administradas com adjuvante ISCOMATRIX® (CLEMETS et al., 2010). Atualmente, um ensaio de Fase 1 de um candidato a vacina de subunidade tetravalente (V180, anteriormente referido como 80E) é patrocinado pela Merck utilizando al-hidrogel ou ISOCOMATRIX® como adjuvantes em comparação com a vacina sem adjuvante.

CONCLUSÃO

Existe ainda grande necessidade de estudos para entender a patogênese da infecção, uma vez que, na prática, a dengue se comporta como se houvesse quatro agentes causais distintos, e entender os mecanismos moleculares associados a evolução para a forma grave, ou como infecções sequenciais interferem nessa evolução é necessário.

Os avanços das vacinas candidatas nos ensaios clínicos tornam o tratamento e controle da dengue cada vez mais palpáveis, refletindo as décadas de atividades de pesquisa e desenvolvimento. A testagem e

avaliação da eficácia dessas vacinas é essencial, pois a imunidade a longo termo em populações vacinadas pode ter comportamento diferente de acordo com o sorotipo (a proteção para alguns sorotipos pode ser mais longa ou curta do que para outros), e isso tem impacto no potencial de ocorrência de formas graves anos após a vacinação.

Apesar destes desafios, o desenvolvimento vacinal se apresenta como uma ferramenta complementar importante no combate à dengue, e potencialmente outras arboviroses, como a chik e zika, em especial em um cenário em que ferramentas de combate vetorial sozinhas, não tem produzido resultado satisfatório no combate à estas doenças.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKETT, C. G., TJADEN, J.; BURGESS, T. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase I clinical trial. *Vaccine*. v. 29, n. 5, p. 960–968, 2011.
- BHAMARAPRAVATI, N.; SUTEE, Y. Live attenuated tetravalent dengue. *Vaccine*. v. 26, n. 18, p. 44–47, 2000.
- BHATT, S., GETHING, P. W., BRADY, O. J., MESSINA, J. P., FARLOW, A. W., MOYES, C. L., WINT, G. R. W. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.
- BRASIL. Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 5. ed. – Brasília, 2006.
- CAPEDING, R. Z.; LUNA, I. A.; BOMASANG, E.; LUPISAN, S.; LANG, J.; FORRAT, R., et al. Live-attenuated, tetravalent dengue vaccine in children, adolescents and adults in a dengue endemic country: Randomize controlled phase I trial in the Philippines. *Vaccine*. v. 29, n. 22, p. 3863-72, 2011.
- CAPEDING, M. R.; TRAN, N. H.; HADINEGORO, S. R.; ISMAIL, H. I.; CHOTPITAYASUNONNDH, T.; CHUA, M. N., et al. Clinical efficacy and safety pf a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: A phase 3, randomized, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*. v. 384, n. 9951, p. 1358-65, 2014.
- CLEMETS, D. E., COLLER, B. G., LIEBERMAN, M. M., OGATA, S., WANG, G., HARADA, K. E., HUMPHREYS, T. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: Immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine*, v. 28, n. 15, p. 2705–2715, 2010.
- CLEMETS, D. E., COLLER, B. G., LIEBERMAN, M. M., OGATA, S., HARADA, K. E., PUTNAK, J. R., HUMPHREYS, T. *NIH Public Access*, v. 28, n. 15, p. 2705–2715, 2011.

- COLLER, B. G.; CLEMENTS, D. E. Dengue vaccines: progress and challenges. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 391–398, 2011.
- COSTA, N., FERREIRA, L. D. A., VASCONCELOS, P. F. C., & CAIRNCROSS, S. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 9, p. 757–762, 2002.
- DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. Review Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. **Cell**, v. 162, n.3, p. 488–492, 2015.
- DURBIN, A. P.; WHITEHEAD, S. S.; MCARTHUR, J.; PERREAULT, JR.; BLANEY JR. J. E.; THUMAR, B. et al. rDEN4delta30, a live attenuated dengue virus type 4 vaccine candidates, is safe, immunogenic, and highly infectious in healthy adult volunteers. **J Infect Dis**. v. 191, n. 5, p. 710–8, 2005.
- GEORGE, S. L., WONG, M. A., DUBE, T. J. T., BOROUGHS, K. L., STOVALL, J. L., LUY, B. E., ... STINCHCOMB, D. T. Safety and Immunogenicity of a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Candidate in Flavivirus-Naive Adults: A Randomized, Double-Blinded Phase 1 Clinical Trial, 1–10. 2015. <http://doi.org/10.1093/infdis/jiv179>
- GUY, B.; Ã, J. W. A. Towards a dengue vaccine: Progress to date and remaining challenges, 31, 239–252. 2008. <http://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.07.011>
- HALSTEAD, S. B. Antibodies determine virulence in dengue. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1171 Suppl 1, 2009.
- HEILMAN, J. M., DE WOLFF, J., BEARDS, G. M., & BASDEN, B. J. Dengue fever: A Wikipedia clinical review. **Open Medicine**, v. 8, n. 4, p. 105–115, 2014.
- HUU, T. N.; QUANG, L. C.; VU, T. Q. H.; FORRAT, R.; LANG, J.; et al. Safety and immunogenicity of recombinant, live attenuated tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in healthy Vietnamese adults and children. **J Vaccines Vaccin**. v. 3, n. 162, 2012.
- HUANG, C. Y. H.; KINNEY, R. M.; LIVENGOOD, J. A.; BOLLING, B.; ARGUELLO, J. J.; LUY, B. E.; STINCHCOMB, D. T. Genetic and Phenotypic Characterization of Manufacturing Seeds for a Tetravalent Dengue Vaccine (DENVax). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, 2013.
- KLIKS, S. C., NISALAK, A., BRANDT, W. E., WAHL, L., & BURKE, D. S. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 4, p. 444–451, 1989.
- MURRELL, S., WU, S., & BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 239–247, 2011.
- OSORIO, J. E., HUANG, C. Y. H., KINNEY, R. M., & STINCHCOMB, D. T. Development of DENVax: A chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. **Vaccine**, v. 29, n. 42, 7251–7260, 2011.
- PUTNAK, R., BARVIR, D. A., BURROUS, J. M., DUBOIS, D. R., ANDREA, V. M. D., HOKE, C. H., ECKELS, K. H. Development of a Purified, Inactivated, Dengue-2 Virus Vaccine Prototype in Vero Cells: Immunogenicity and Protection in Mice and Rhesus Monkeys, 23–30, 1996.
- RUPP R. et al. Safety and immunogenicity of different doses and schedules of a live attenuated tetravalent dengue vaccine (TDV) in healthy adults: A Phase 1b randomized study. **Vaccine**. v. 33, p. 6351–6359, 2015.
- THOMAS, S. J., ECKELS, K. H., CARLETTI, I., DE LA BARRERA, R., DESSY, F., FERNANDEZ, S.; INNIS, B. L. A phase II, randomized, safety and immunogenicity study of a re-derived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 1, p. 73–88, 2013.
- VILLAR, L.; DAYAN, G. H.; ARREDONDO-GARCÍA, J. L.; RIVERA, D. M.; CUNHA, R.; DESEDA, C.; et al. CYD15 study group. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **New England Journal of Medicine**. v. 372, n. 2, p. 113-23, 2015.
- WHO. World Health Organization. Dengue, 2016.