

Genética de las poblaciones virales y transmisión del dengue

Jorge Falcón-Lezama, M en C,⁽¹⁾ Gilma Guadalupe Sánchez-Burgos, Dra en C,⁽²⁾
José Ramos-Castañeda, Dr en C.⁽³⁾

Falcón-Lezama J, Sánchez-Burgos GG,
Ramos-Castañeda J.

Genética de las poblaciones virales
y transmisión del dengue.

Salud Publica Mex 2009;51 suppl 3:S403-S409.

Falcón-Lezama J, Sánchez-Burgos GG,
Ramos-Castañeda J.

Population genetics of dengue virus
and transmission of dengue fever.

Salud Publica Mex 2009;51 suppl 3:S403-S409.

Resumen

El comportamiento endémico de la fiebre por dengue en México durante los últimos cinco años ha generado gran preocupación en todos los sectores relacionados con la salud. Los esfuerzos para interrumpir la transmisión se han concentrado en el control vectorial; sin embargo, al margen de la efectividad de las intervenciones, resulta importante establecer con claridad cuáles son los elementos determinantes de la transmisión del dengue para establecer medidas de control y vigilancia eficaces. En cuanto a los determinantes moleculares de la transmisión, mucho se ha avanzado con el desarrollo de la genómica y la bioinformática. Esta revisión pretende ofrecer un panorama de los desarrollos más recientes en ese aspecto con un énfasis en la situación de México.

Palabras clave: dengue; epidemiología molecular; transmisión; México

Abstract

The endemic behavior of dengue fever in Mexico during the past five years is of major concern to every sector related with public health and the effort to control the transmission has been focused on vector control. However, regardless of the effectiveness of the intervention measures it is important to know which elements determine dengue transmission. With regard to the molecular basis for dengue transmission, a great deal of progress has been made due to the introduction of genomic and bioinformatic approaches. The goal of this review is to describe the most recent developments in this area with emphasis on the Mexican situation.

Key words: dengue; transmission; molecular epidemiology; Mexico

La fiebre por dengue (FD) y la fiebre hemorrágica por dengue (FHD) son un problema de salud pública, ya que dos quintas partes de la población mundial se encuentran en riesgo.¹ A principios de la década de 1970 se propuso una explicación de la fisiopatología de la FHD,² según la cual los casos hemorrágicos ocurren más a menudo en individuos con infecciones consecutivas a diferentes serotipos del virus del dengue (DENV); esta hipótesis se conoce como la potenciación inmunitaria o

ADE (del inglés *antibody dependent enhancement*).³ Si bien hoy en día una variación de esta hipótesis es todavía la mejor explicación de la fisiopatología de la FHD,⁴ estudios recientes han demostrado que su utilidad para explicar la transmisión de la enfermedad en la población es limitada.⁵ El mayor desafío a la potenciación inmunitaria surge de los estudios de epidemiología molecular y genética de poblaciones virales que, con el desarrollo de la genómica y la bioinformática, han establecido el

(1) Departamento de Prevención y Control de Enfermedades, Servicios de Salud del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.

(2) Instituto Mexicano del Seguro Social, CMN Ignacio García Téllez. Unidad de Investigación Médica. México, DF, México.

(3) Departamento de Inmunidad, Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, INSP. Cuernavaca, Morelos, México.

Fecha de recibido: 28 de julio de 2008 • Fecha de aceptado: 10 de febrero de 2009

Solicitud de sobretiros: Dr. José Ramos Castañeda. Departamento de Inmunidad, Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Av. Universidad 655, Col. Santa María Ahuacatlán. 62100 Cuernavaca, Morelos, México.

Correo electrónico: jcastane@insp.mx

estado del arte en la discusión sobre la transmisión del DENV.^{6,7} Esta revisión pretende revisar los aspectos más relevantes de este conocimiento nuevo, con especial mención de la escasa información disponible para América y en particular para México.

Los serotipos del DENV

El DENV pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y tiene cuatro serotipos (DENV-1 a 4);⁸ de alrededor de 40 nm de diámetro, es esférico y tiene bicapa lipídica, la cual constituye su envoltura junto con dos proteínas virales, la M y la E.⁹ Tiene una nucleocápside icosaédrica constituida por la proteína C, a la que se vincula el genoma viral, una hebra sencilla de RNA de polaridad positiva de unas 11 kilobases de longitud;¹⁰ el extremo 5' del genoma tiene un Cap de tipo I y una región no traducida de alrededor de 100 bases, después de la cual se localiza un marco de lectura que contiene a las secuencias que codifican a las proteínas C, preM/M, E, NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5. Proteasas celulares y virales procesan la poliproteína que resulta de su traducción; el genoma se completa con una región no traducida (RNT) 3' de casi 500 bases y sin poliadenilación.¹⁰ La tasa de mutación del genoma varía según sea el serotipo, de 4.5×10^{-4} sustituciones por sitio cada año para DENV-1 a 9×10^{-4} para DENV-3,¹¹ la cual es menor a la del virus de RNA, que tiene alrededor de 10^{-3} sustituciones por sitio por año. La razón de ello es controversial, pero el vector tiene al parecer una función relevante en la selección de variantes genéticas como factor de estabilidad genómica.¹²

La importancia biológica de las variedades genéticas del DENV se comenzó a estudiar sólo hasta fecha reciente; Rico-Hesse ha propuesto que la variante DENV-2 del sureste asiático tiene una mayor virulencia en comparación con la variante americana del mismo serotipo.¹³ Los estudios han demostrado que la tasa de replicación de la variante del sureste asiático es casi dos veces mayor que la de la variante americana¹⁴ y también que la primera desplaza a la segunda durante una coinfección de mosquitos de laboratorio.^{15,16} El estudio del genoma de los DENV en relación con su comportamiento biológico ha llevado a observaciones desconcertantes. Por ejemplo, los DENV-2 de ciclo selvático tienen tasas de replicación similares a las de los DENV-2 americanos,¹⁴ un hallazgo singular porque se suponía que los DENV de origen selvático no contribuían a la transmisión del dengue; por lo tanto, los virus del ciclo selvático pueden desplazarse al ciclo endémico-epidémico con facilidad, con consecuencias considerables para la salud pública.¹⁷ Sin embargo, la

situación descrita tiene años de presentarse en África, sin documentarse brotes por virus selváticos. En realidad, el mismo resultado podría interpretarse como que los DENV-2 americanos "limitan" la transmisión porque comparten características con los virus selváticos.

Las bases moleculares de la virulencia del DENV son motivo de controversia, toda vez que se cree que la tasa de replicación está determinada por elementos que actúan en *trans* y elementos *cis* del genoma viral.¹⁸ Uno de los elementos *cis* mejor caracterizados en términos de su relación con la virulencia de la cepa viral es la configuración de la RNT 3'.¹⁹ Dado que esta región no está sujeta a presión de selección inmunitaria, las mutaciones que ocurren en ella dependen de presión por adecuación, por lo que prevalecen aquellas que confieren una ventaja en el desempeño del control replicativo. Este razonamiento se ha documentado y se ha demostrado que la RNT 3' de los virus del sureste asiático regulan de modo más eficiente el inicio de la replicación del RNA en comparación con los virus americanos.^{20,21}

La transmisión del dengue

Se asume que la transmisión del dengue depende de características específicas de la población humana, el vector y el virus;²² no obstante, el peso particular de cada una de ellas y sus interacciones son motivo de conjetura. En el sureste asiático, en particular en Tailandia, la transmisión endémica-epidémica muestra un patrón cíclico casi de tres años, existe cocirculación de los cuatro serotipos y el grupo de edad más afectado por la FHD es el de menores de 15 años.²³ De acuerdo con la hipótesis de la ADE, basta conocer el serotipo circulante y el estado inmunitario de la población para establecer un modelo de transmisión. Dado que esta hipótesis es la dominante, los sistemas de vigilancia epidemiológica del dengue en América se basan en esta presunción; empero, con la excepción de Cuba, la transmisión del DENV en el continente americano no parece ajustarse a este modelo. En 1999, un estudio realizado en la población peruana de Iquitos,²⁴ con antecedentes de un brote causado por DENV-1 en 1990, y en el que se vigilaban la introducción de DENV-2 y la frecuencia de casos de FHD, no demostró aumentos significativos de la morbilidad relacionada o el número de casos de FHD, situación que debió presentarse en concordancia con la hipótesis de ADE. Esto podría explicarse porque el genotipo de DENV-2 que circulaba en ese momento era el americano, el cual tiene una baja virulencia.²⁵ Existen ejemplos semejantes documentados en América y el sureste asiático,^{26,27} razón por la cual se considera hoy en día que la ADE es un modelo insuficiente para explicar la transmisión del dengue.

En 1977 se propuso una hipótesis alternativa a la ADE para explicar la aparición de casos hemorrágicos.²⁸ Se basó en la observación de que hay casos de FHD en infecciones primarias y que los virus causantes podrían tener una virulencia aumentada; no obstante, careció de respaldo experimental hasta que se desarrollaron los métodos para el análisis genómico. El trabajo de Rico-Hesse proporcionó evidencia de que diversos serotipos de DENV se agrupaban en conjuntos genéticamente relacionados que podían vincularse con brotes hemorrágicos.¹³ La principal predicción de esta hipótesis señala que el reemplazo de las poblaciones virales autóctonas por otras de mayor virulencia incrementa la morbilidad.¹⁸ Infortunadamente, hay muchos problemas para evaluar con rigor esta predicción puesto que todos los sistemas de vigilancia se basan en los casos de gravedad suficiente para ser notificados, lo cual introduce un sesgo porque hasta 90% de las infecciones por DENV es indiferenciado o asintomático.²⁹ Otro obstáculo es que el número de muestras es insuficiente para establecer correlaciones estadísticamente significativas, parte de lo cual se debe a que los análisis se han realizado con diferentes secuencias del genoma viral.³⁰⁻³³ Dado que no existe un modelo de dinámica de poblaciones del DENV, no hay forma de evaluar el periodo de reemplazo de una población viral por otra; por ejemplo, se estima que la introducción de la variante del sureste asiático de DENV-2 en México ocurrió a mediados del decenio de 1990, si bien los brotes más graves en ese periodo se atribuyeron al DENV-3 y casi todos los aislamientos de DENV-2 entre 2000 y 2002 pertenecen al genotipo americano-asiático.³⁴

En un esfuerzo por identificar determinantes de la transmisión, Wearing³⁵ y Adams³⁶ publicaron de manera independiente dos modelos que, en esencia, llegan a la misma conclusión: la periodicidad de la transmisión del dengue depende sólo de la reacción inmunitaria cruzada y neutralizante de corta duración. La respuesta inmunitaria protectora contra el dengue se asume que es específica de serotipo y de por vida, aunque durante el periodo convaleciente de cualquier infección por dengue existen anticuerpos neutralizantes contra el resto de los serotipos cuya duración es de 2-9 meses.³⁷ ³⁸ Se desconoce el papel de estos anticuerpos en la fisiopatología del dengue, pero se puede asegurar que tiene efectos en la selección de las variantes del DENV. Por ejemplo, se esperaría que al ser una respuesta cruzada, la neutralización debería afectar por igual a cualquiera de los genotipos virales; en consecuencia, una vez que la variante autóctona se establece y circula, la introducción de un nuevo genotipo debería llevar a la extinción de la variante autóctona; sin embargo, lo que se observa es que mientras hay variantes que experimentan la extin-

ción, hay otras que persisten.³⁶ Asimismo, la inmunidad cruzada de corta duración explica por qué, si bien existe un periodo cíclico de más o menos tres años en la transmisión de dengue en promedio, sólo se observa sincronía en la transmisión de DENV-2 y DENV-3, mientras que para el DENV-4 los picos de transmisión se desfasan en intervalos mayores. La inmunidad cruzada de corta duración podría explicar la supresión de la transmisión del DENV-4 por la inmunidad que generan los serotipos más virulentos como DENV-2 y DENV-3.

Una limitante en el estudio de la transmisión, en particular en América, consiste en que la información de casos incidentes es relativamente escasa, tanto en número de casos como en escala de tiempo.³⁹ En otras áreas geográficas, como en Tailandia, se cuenta con un registro riguroso de casos. Ahí se ha podido determinar que la transmisión parece seguir un patrón de dispersión en "ola",⁴⁰ en el cual los brotes inician en un foco primario, a partir del cual se dispersan de forma radial los casos secundarios; con el tiempo, el número de casos totales se mantiene a expensas de los focos secundarios, mientras que los casos disminuyen en el foco primario; por lo tanto, los casos de FHD se dispersan en Tailandia a una velocidad de 148 km/mes. En el continente americano la situación difiere:⁴¹ la intensidad de la transmisión es relativamente baja y los casos tienden a presentarse de modo más frecuente entre jóvenes adultos, en contraste con el sureste asiático, donde FD/FHD es una enfermedad predominantemente infantil. Se ha explorado la relación entre un patrón de baja transmisión y el grupo de edad afectado⁴² y se ha encontrado que, en Tailandia, las medidas de control redujeron la incidencia de FHD en la población infantil, pero ésta aumenta en los jóvenes adultos, por lo que se ha sugerido que existe una relación inversa entre la intensidad de transmisión del dengue y la edad de mayor incidencia de casos. En México, resultados preliminares de un proyecto de investigación, cuyo objetivo es caracterizar las redes epidemiológicas de dispersión de los casos de dengue, muestran que los casos se localizan con mayor frecuencia en poblaciones con alta densidad poblacional y bien comunicadas por carreteras durante la temporada de lluvias, cuando se alcanza el máximo de densidad vectorial; estas observaciones son inconsistentes con el modelo de la "ola" y parecen ajustarse a un modelo de transmisión de la influenza denominado "gravitacional".⁴³ En este modelo existe un número de localidades primarias o focos gravitacionales primarios en los que muy frecuentemente se presentan casos y a partir de los cuales se observa una dispersión a un número limitado de localidades secundarias; la diferencia entre las localidades primarias y las secundarias es la densidad de población; cuanto mayor es ésta, el número de casos tiende a mantenerse

constante y la velocidad de dispersión del brote depende de la densidad de población y las vías de comunicación entre las poblaciones primarias y secundarias.

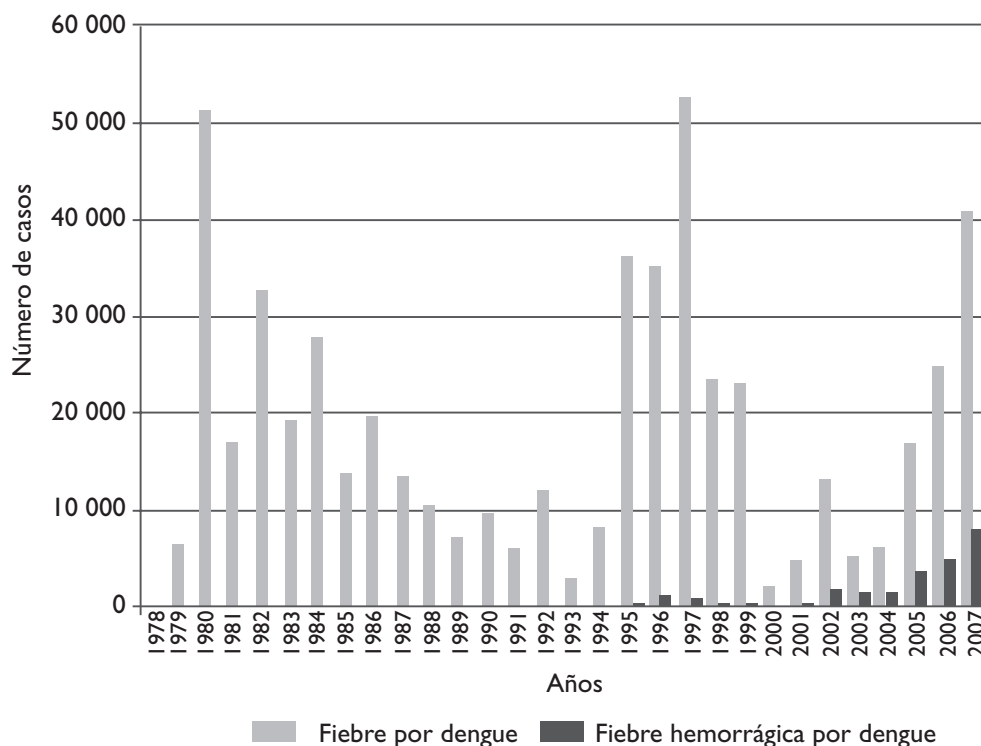
El dengue en México

Después de las campañas de erradicación de la fiebre amarilla en los decenios de 1950 y 1960 se logró la desaparición temporal del mosquito *Aedes aegypti* en la mayor parte del continente.⁴⁴ Tras el abandono de estas actividades, pasó poco tiempo para que el vector reapareciera con la consiguiente identificación de casos de FD. México no fue la excepción y empezó a comunicar casos a partir de 1978;⁴⁵ desde entonces y hasta el 2007 se ha observado un comportamiento cíclico en la aparición de brotes hasta de 50 000 casos, seguidos por años en los que el número de casos disminuye (figura 1).⁴⁶ Esto parece ocurrir nuevamente desde el año 2000, con un notorio incremento de los casos desde menos de 2 000 hasta más de 48 000 a finales de 2007.

La información disponible desde 1995⁴⁶ demuestra la circulación de todos los serotipos durante este periodo; no obstante, la frecuencia de los aislamientos por

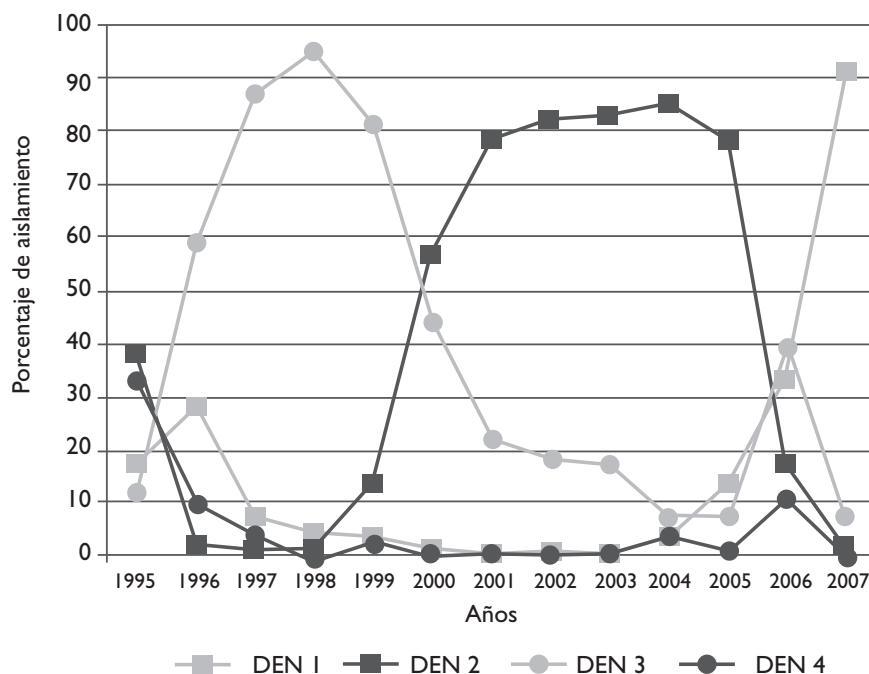
serotipo ha variado y se han registrado incrementos asincrónicos de ésta (figura 2); lo anterior contrasta con la sincronía observada entre los serotipos DENV-2 y DENV-3 informada en Asia.³⁶ En el caso del DENV-3 se reconoció un incremento de su frecuencia de aislamiento entre 1996 y 2000, el cual parece relacionarse con el aumento de la morbilidad notificado durante esos años. En cambio, el DENV-2 es el serotipo aislado con más frecuencia en los años en que el número de casos comunicados alcanza sus niveles más bajos y su frecuencia desciende a medida que se empieza a registrar un incremento del número de casos, posiblemente a causa del DENV-1 desde 2004 (figuras 1 y 2).

Lo anterior cobra importancia al señalar que entre 2000 y 2004, los años en que el DENV-2 es el aislado de mayor predominio, el número de casos de FD parece estabilizarse (figura 1). Una posible explicación para este comportamiento es que en el lapso de 1982 a 1992 una proporción de la población se inmunizó quizá con DENV-2 y, a partir de entonces, el número de casos consecutivos a este serotipo durante los brotes de FD representa una minoría en comparación con los secundarios a otros serotipos; de manera alternativa, la cepa



Fuente: Dirección General de Epidemiología

FIGURA 1. CASOS DE FIEBRE POR DENGUE Y FIEBRE HEMORRÁGICA POR DENGUE EN MÉXICO DE 1978 A 2006



Fuente: Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades

FIGURA 2. PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS DE SEROTIPOS DEL VIRUS DEL DENGUE EN MÉXICO DE 1995 A 2005

autóctona anterior a 2000 pudo reemplazarse por una cepa importada, ya que entre 1996 y 1999 el número de aislamientos de este serotipo fue mínimo y para 2001 el genotipo asiático-americano fue el más recuperado.

Infortunadamente, la escasa información virológica disponible limita el panorama sobre lo que sucede fuera de los brotes, o bien lo ocurrido en años anteriores. Para ello se necesitan estudios sobre el estado de la memoria inmunológica en las diferentes regiones del país, incluidos no sólo los casos sintomáticos. En este sentido, un estudio reciente en estudiantes universitarios en Tabasco⁴⁷ reveló una seroprevalencia de 9% de anticuerpos IgG contra el virus del dengue; al caracterizar los anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo, se observó que esta población se había inmunizado por todos los serotipos y que la totalidad de los sujetos positivos tenía anticuerpos contra el DENV-2, seguidos en menor proporción por el DENV-4 (68%), DENV-1 (20%) y DENV-3 (4%). Esto sugiere una notable memoria inmunológica contra el DENV-2 en la población joven de Tabasco.⁴⁶

Es de resaltar que, si bien el número de casos desde 1978 a 2007 indica un patrón cíclico con brotes separados por casi 20 años entre sí (1980 y 1997), el brote de 2007

parece acortar este periodo (figura 1), lo cual podría significar que a medida que se establece la circulación de todos los serotipos, se podrían observar episodios epidémicos con una mayor frecuencia, tal y como al parecer ocurre en el sureste asiático.

Existen varios puntos que dificultan el análisis, interpretación y uso de la información virológica disponible para entender la transmisión. Entre ellos puede mencionarse el bajo número de aislamientos, el cual desde el año 2000 hasta el 2006 osciló entre 150 y 200 por año (figuras 1 y 2). Esta situación abre la posibilidad de que el muestreo no sea representativo y las dificultades para mantener la logística para obtener muestras adecuadas para la identificación viral podrían sesgar los resultados con muestras procedentes de poblaciones bien comunicadas y no en todos los casos con brotes. La escasa información sobre genotipos limita la evaluación de las hipótesis referentes a la virulencia. Hay que considerar además los estudios sobre la memoria inmunológica de la población en periodos interepidémicos y la prevalencia de anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo, que sin duda aportarían información crucial para la vigilancia epidemiológica y la aplicación de vacunas para prevenir esta enfermedad.

Perspectivas

Si se considera que las actividades contra el dengue se dirigen al control, definido como la reducción de la incidencia, prevalencia, morbilidad o mortalidad de una enfermedad a un nivel aceptable, y no la eliminación, definida como la reducción a cero de la incidencia de una enfermedad específica en un área geográfica específica,⁴⁸ es necesario aceptar que existe una transmisión de baja intensidad y ésta, aunque genera casos, tiene un potencial limitado para la generación de brotes. Dado que para lograr un control lo más conveniente es la prevención de la aparición de brotes de gran magnitud, es necesario realizar investigación en la dinámica de transmisión del dengue. Esto es crucial, ante el panorama de que aún no existe una estimación sobre cuándo se dispondrá de una vacuna eficaz⁴⁹ y que, si bien promisorio, la terapia génica basada en la inhibición de moléculas que intervienen en la interacción virus-células como es el caso de CLEC5A, que es una lectina de la misma familia del receptor DC-SIGN para el DENV,⁵⁰ para el tratamiento de los casos graves del dengue se halla en fase de investigación básica.

Referencias

- Rigau-Perez JG. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1998;352(9132): 971-977.
- Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 1988;239(4839): 476-481.
- Sangkawibha N. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 1984;120(5): 653-669.
- Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol* 2007;85(1): 43-45.
- Chevillon C, Failloux AB. Questions on viral population biology to complete dengue puzzle. *Trends Microbiol* 2003;11(9): 415-421.
- Holmes EC. The evolutionary biology of dengue virus. *Novartis Found Symp* 2006;277:177-187; discussion 187-192, 251-253.
- Holmes EC. Viral evolution in the genomic age. *PLoS Biol* 2007; 5(10): 278.
- Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003;59:23-61.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(1):13-22.
- Alvarez DE. Structural and functional analysis of dengue virus RNA. *Novartis Found Symp* 2006;277:120-32; discussion 132-135, 251-253.
- Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol* 2003;20(1):122-129.
- Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol* 2008;53:273-291.
- Leitmeyer KC. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 1999;73(6):4738-4747.
- Vasilakis N. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology* 2007;358(2): 402-412.
- Armstrong PM, Rico-Hesse R. Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2001;1(2):159-168.
- Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol* 2005;79(2):853-859.
- Vasilakis N. Evolutionary processes among sylvatic dengue type 2 viruses. *J Virol* 2007;81(17):9591-9595.
- Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 2003;59: 315-341.
- Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 2008;371(9611):500-509.
- Alvarez DE. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* 2005;339(2):200-212.
- Holden KL, Harris E. Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology* 2004;329(1):119-133.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):480-496.
- Nisalak A. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68(2):191-202.
- Watts DM. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet* 1999;354(9188):1431-1434.
- Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol* 2003;77(7):3929-3938.
- Harris E. Clinical, epidemiologic, and virologic features of dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63(1-2):5-11.
- Endy TP. Relationship of preexisting dengue virus (DV) neutralizing antibody levels to viremia and severity of disease in a prospective cohort study of DV infection in Thailand. *J Infect Dis* 2004;189(6):990-1000.
- Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1977;26(3):337-343.
- Endy TP. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol* 2002;156(1):40-51.
- Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 1990;174(2): 479-493.
- Mota J. Phylogenetic analysis of the envelope protein (domain III) of dengue 4 viruses. *Salud Publica Mex* 2002;44(3):228-236.
- Zanotto PM. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(2):548-553.
- Adams B, Boots M. Modelling the relationship between antibody-dependent enhancement and immunological distance with application to dengue. *J Theor Biol* 2006; 242(2):337-346.
- Diaz FJ. Dengue virus circulation and evolution in Mexico: a phylogenetic perspective. *Arch Med Res* 2006;37(6):760-773.
- Wearing HJ, Rohani P. Ecological and immunological determinants of dengue epidemics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(31):11802-11807.
- Adams B. Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(38):14234-14239.
- Rohani P. Population dynamic interference among childhood diseases. *Proc Biol Sci* 1998;265(1410):2033-2041.
- Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest* 2004;113(7):946-951.
- Heffernan JM, Smith RJ, Wahl LM. Perspectives on the basic reproductive ratio. *J R Soc Interface* 2005;2(4):281-293.
- Cummings DA. Travelling waves in the occurrence of dengue haemorrhagic fever in Thailand. *Nature* 2004;427(6972):344-347.

41. Halstead SB. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica* 2006;20(6):407-415.
42. Nago Y, Koelle K. Decreases in dengue transmission may act to increase the incidence of dengue hemorrhagic fever. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(6):2238-2243.
43. Viboud C. Synchrony, waves, and spatial hierarchies in the spread of influenza. *Science* 2006;312(5772):447-451.
44. Torres-Munoz A. Yellow fever in Mexico. The eradication of *Aedes aegypti*. 1966. *Salud Publica Mex* 1995;37(Suppl):S103-10; discussion S98.
45. Kaplan JE. Epidemiologic investigations of dengue infection in Mexico, 1980. *Am J Epidemiol* 1983;117(3):335-343.
46. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Panorama Epidemiológico (México). México, DF: DGE/SS, 2008.
47. Sánchez-Burgos G, López-Alvarado MA, Castaneda-Desales D, Ruiz-Gómez J, Ramos-Castaneda J. Prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos del virus Dengue en estudiantes universitarios del estado de Tabasco, México. *Salud Publica Mex* 2008;50(5):362-366.
48. Dowdle WR. The principles of disease elimination and eradication. *Bull World Health Organ* 1998;76(Suppl 2):22-25.
49. Edelman R. Dengue vaccines approach the finish line. *Clin Infect Dis* 2007;45(Suppl 1):S56-S60.
50. Chen ST. CLECSA is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature* 2008;453(7195):672-676.