



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

Diseño, producción y evaluación de un antígeno quimérico del virus del Zika

Tesis para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Miranda López Arleth

Director de Tesis: Dr. Sergio Rosales Mendoza

Codirector de Tesis: Dr. Mauricio Comas García

San Luis Potosí, S. L. P.

Marzo, 2026



UASLP-Sistema de Bibliotecas

Repositorio Institucional Tesis Digitales Restricciones de Uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

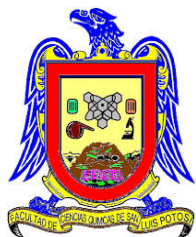


Diseño, producción y evaluación de un antígeno quimérico del virus del Zika © 2026 por Miranda López Arleth se distribuye bajo una licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biofarmacéuticos del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) adscrito a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), en el periodo comprendido entre febrero del 2022 a enero del 2026, bajo la dirección del Dr. Sergio Rosales Mendoza y el Dr. Mauricio Comas García, y fue apoyado por **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), número de convenio 848290 y 321364**, de donde se obtuvieron los recursos para la realización del trabajo.

El programa de Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del SECIHTI, registro 0003383. Número de beca otorgada por SECIHTI CVU:1008027.

Los datos del trabajo titulado “Diseño, producción y evaluación de un antígeno quimérico del virus del Zika” se encuentran bajo resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

REGISTRO DE TEMA DE TESIS

Fecha: 07/06/2022

NOMBRE DEL ALUMNO:

M.C. Arleth Miranda López

TEMA DE TESIS:

Diseño, producción y evaluación de un antígeno quimérico del virus del Zika

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN EN LA QUE SE INSERTA LA TESIS:

Desarrollo y evaluación de medicamentos

SUBCOMITÉ TUTORIAL

	NOMBRE	DEPENDENCIA ACADÉMICA DE ADSCRIPCIÓN	FIRMA
Director de Tesis	Dr. Sergio Rosales Mendoza	Facultad de Ciencias Químicas UASLP	
Co-director de Tesis	Dr. Mauricio Comas García	Facultad de Ciencias UASLP	
Asesor	Dra. Claudia Guadalupe Castillo Martín del Campo	Facultad de Medicina UASLP	
Asesor	Dr. Omar González Ortega	Facultad de Ciencias Químicas UASLP	
Asesor	Dra. Leticia Moreno Fierros	UNAM FES-Iztacala	

Trabajo de tesis vinculada con:

Convenio _____ Servicio _____ Proyecto X Grupo _____ Artículo _____

Financiamiento de Tesis otorgado por:

UASLP, recursos de ingresos extraordinarios derivados de asesorías y servicios.

Nombre del Proyecto en su caso: NA

Monto: \$NA

Fecha de ejecución del proyecto: NA

Objetivo del proyecto:

 NA

¿El proyecto involucra manejo de muestras biológicas (animales, plantas, microorganismos, humanos, líneas celulares) y requiere del aval del Comité de Ética e Investigación de la FCQ?

Sí X No

En caso de responder sí, se deberá presentar la carta del aval antes de presentar el seminario de propuesta de Tesis.

Proyecto avalado por el dictamen del CIED número: CEID2015048

El Comité Académico define si el proyecto de tesis requiere del aval del Comité de Ética e Investigación

Nombre y firma de Director de Tesis

Dr. Sergio Rosales Mendoza



02 de Septiembre 2025

**COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE
LABORATORIO (CICUAL)
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UASLP**

DR. SERGIO ROSALES MENDOZA

PROFESOR INVESTIGADOR DEL CICSAB

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS DE LA UASLP.

PRESENTE:

Estimado profesor investigador, la presente es para informarle que por decisión unánime, el COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO, de la Facultad de Medicina de la UASLP, reviso y aprobó su proyecto de investigación titulado, *"Evaluación de la protección vertical inducida por la vacuna rpZDIII contra el virus del ZIKA en un modelo murino."*, Asignando la clave BGFMUASLP-29-25.

Para los fines legales que al interesado convengan, se extiende la presente **CONSTANCIA**, a los Dos días del mes de Septiembre del año Dos mil Veinticinco.

M.C.A. Juan Francisco López Rodríguez

Director del CICUAL

RECIBIDO
02 SEP 2025
SECRETARIA GENERAL

uaslp.mx

Av Carranza 2405
76100 Potosí, SLP.
26 2344 al 49
14441976 7350

RECIBIO

HORA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

Diseño, producción y evaluación de un antígeno quimérico del virus del Zika

Tesis para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Miranda López Arleth

SINODALES

Presidente: Dr. Omar González Ortega

Secretaria: Dra. Claudia Guadalupe Martín del Campo

Vocal: Dra. Leticia Moreno Fierros

Vocal: Dr. Mauricio Comas García

Vocal: Dr. Sergio Rosales Mendoza

Vocal: Dra. Alejandra Wong Arce

San Luis Potosí, S. L. P.

Marzo, 2026

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dr. Sergio Rosales Mendoza. Director de Tesis

Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Mauricio Comas García. Co-Director de Tesis

Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Claudia Guadalupe Castillo Martín del Campo. Asesora de Tesis

Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Omar González Ortega. Asesor de Tesis

Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Leticia Moreno Fierros. Asesora de Tesis

Facultad de Estudios Superiores de la Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas
Programa de Doctorado

Formato D5

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí, SLP 04/ marzo/ 2026

En la ciudad de San Luis Potosí el día 04 del mes de marzo del año 2026. La que suscribe Arleth Miranda López Alumna del programa de posgrado en Ciencias Farmacobiológicas adscrito a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dr. Sergio Rosales Mendoza y Dr. Mauricio Comas García y cede los derechos del trabajo titulado “Diseño, producción y evaluación de un antígeno quimérico del virus del Zika” a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección arlethmiranda@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Arleth Miranda López



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas
Programa de Doctorado

Formato D28

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 14 de febrero del 2026

L.B. Reyna Nayeli Ortiz Quintero

Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada “**Diseño, producción y evaluación de un antígeno quimérico del virus del Zika**” presentada por el autor Arleth Miranda López. La tesis es requisito para obtener el grado de Doctorado en el Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de **37%** excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dra. Claudia Escudero Lourdes
Coordinador Académico del Posgrado
en Ciencias Farmacobiológicas

DEDICATORIA Y AGREDECIMIENTOS

A mis padres, por ser siempre mi hogar.

Por acompañarme en cada paso, incluso cuando el camino parecía demasiado largo. Su amor, confianza y presencia constante han sido el motor que me permitió llegar hasta aquí.

A mi mami, porque desde que era niña ha cuidado de mí con una entrega infinita. Por cada sacrificio silencioso, por cada palabra de aliento y por enseñarme, con su ejemplo, la fortaleza y el amor incondicional. Todo lo que soy también es gracias a ti.

A mi hermano, mi compañero de vida. Gracias por tu cariño, tu apoyo y por estar siempre presente en mi vida. Tenerte a mi lado ha sido una de las mayores fortalezas a lo largo de este camino.

A Salva y a Diego, quienes dejaron una huella profunda en mi vida y en mi corazón. Aunque ya no estén aquí, este logro también lleva un pedacito de ustedes.

A todos ellos, gracias por ser mi refugio, mi fuerza y la razón que me impulsa a seguir adelante.

RESUMEN

El virus del Zika (ZIKV) representa un desafío significativo para la salud pública a nivel mundial debido a su asociación con complicaciones neurológicas graves, como la microcefalia y el síndrome de Guillain-Barré. La ausencia de tratamientos específicos y de vacunas aprobadas convierte el desarrollo de fármacos antivirales y, predominantemente, de prototipos de vacunas seguros y eficaces, en una meta prioritaria. En este trabajo se diseñó y evaluó una proteína multiepitópica recombinante denominada rpZDIII, derivada de secuencias antigénicas de la proteína E del ZIKV. El modelado estructural predijo una conformación adecuada para su rol como antígeno vacunal. La proteína rpZDIII fue expresada en *E. coli* y purificada a partir de cuerpos de inclusión, obteniéndose un producto soluble apto para su evaluación biológica.

La administración subcutánea de rpZDIII en ratones BALB/c generó respuestas humorales robustas, caracterizadas por la inducción de anticuerpos IgG e IgM, así como por actividad neutralizante específica contra ZIKV, lo que confirmó su inmunogenicidad y permitió justificar la evaluación de sus efectos protectores *in vivo*. Las hembras C57BL/6 inmunizadas con rpZDIII bajo un esquema de tres dosis desarrollaron anticuerpos IgG capaces de reconocer la proteína E recombinante de ZIKV. Tras el desafío viral, el 80% de las crías de madres vacunadas sobrevivió y mantuvo un desarrollo normal, mientras que la descendencia del grupo no vacunado presentó una mortalidad del 100%. Respecto a la carga viral, no se detectó ARN viral en el tejido cerebral del grupo vacunado, a diferencia de los controles, que presentaron niveles elevados de ARN de ZIKV.

En general, estos resultados demuestran que la vacuna rpZDIII es inmunogénica e inmunoprotectora, por lo que se propone como candidato vacunal prometedor en la lucha contra el ZIKV.

Palabras clave: vacuna multiepitópica, anticuerpos neutralizantes, antígeno quimérico, desafío viral, inmunidad protectora.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) poses a significant challenge to global public health because it is associated with serious neurological complications, such as microcephaly and Guillain-Barré syndrome. The absence of specific treatments and approved vaccines makes it a priority to develop antiviral drugs and immunogenic vaccine prototypes that are safe and effective. In this study, a recombinant multiepitope protein called rpZDIII was designed and evaluated. It was derived from antigenic sequences of the ZIKV E protein. Structural modeling predicted a conformation suitable for its function as a vaccine antigen. The rpZDIII protein was expressed in *E. coli* and purified from inclusion bodies. This resulted in a soluble product suitable for biological evaluation.

Subcutaneous administration of rpZDIII in BALB/c mice generated robust humoral responses, characterized by the induction of IgG and IgM antibodies, as well as specific neutralizing activity against ZIKV, confirming its immunogenicity and justifying the evaluation of its protective effects *in vivo*. C57BL/6 females immunized with rpZDIII under a three-dose regimen developed IgG antibodies capable of recognizing the recombinant ZIKV E protein. After viral challenge, 80% of the offspring from vaccinated mothers survived and maintained normal development, while the offspring of the unvaccinated group had a 100% mortality rate. With regard to viral load, no RNA was detected in the brain tissue of the vaccinated group, unlike the controls, which had high levels of ZIKV.

Overall, these results demonstrate that the rpZDIII vaccine is immunogenic and immunoprotective, making it a promising vaccine candidate in the fight against ZIKV.

Keywords: multi-epitope vaccine, neutralizing antibodies, chimeric antigen, viral challenge, protective immunity.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
I. Virus del Zika.....	3
Clasificación taxonómica	3
Organización génica.....	4
Proteínas estructurales y no estructurales	5
Ciclo de infección	9
II. Epidemiología.....	10
Brotos históricos de ZIKV	10
Panorama epidemiológico en México	10
Sintomatología	10
Complicaciones	11
III. Vías de transmisión.....	13
IV. Panorama general de vacunas en desarrollo contra ZIKV	14
Vacunas basadas en ácidos nucleicos	15
Vacunas basadas en vectores virales.....	16
Vacunas inactivadas	17
Vacunas atenuadas.....	18
V. Vacunas multiepitópicas.....	21
Diseño	22
Sistema de expresión	25
Vacunas multiepitópicas reportadas contra ZIKV	26
VI. Respuesta inmune frente al ZIKV.....	28
Inmunidad humoral y anticuerpos neutralizantes.....	28
Inmunidad celular	30
JUSTIFICACIÓN	31

HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVOS	34
ARTÍCULO 1	36
ARTÍCULO 2	44
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS	85

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades virales emergentes representan un desafío significativo para la salud pública a nivel global. En las últimas décadas, arbovirus como Zika, Dengue y Chikungunya han experimentado una expansión sostenida, poniendo en riesgo a poblaciones cada vez más amplias. Esta dinámica se ha relacionado con el cambio climático, la urbanización acelerada, la movilidad humana internacional y las limitaciones de las estrategias de control de los vectores (*Liu-Helmersson et al., 2019; Semenza et al., 2022*).

En este contexto, el virus del Zika (ZIKV) se caracteriza por su rápida diseminación y su impacto sanitario. Tras décadas de circulación esporádica, el virus protagonizó grandes brotes en la Polinesia Francesa y, posteriormente, en América, donde las condiciones climáticas extremas favorecieron la proliferación del vector *Aedes aegypti* y propiciaron un amplio brote epidémico en 2016 (*Paz y Semenza, 2016; Tesla et al., 2018; Semenza et al., 2022*).

El ZIKV se transmite principalmente por mosquitos del género *Aedes*, aunque también se ha documentado su transmisión sexual, vertical y por transfusión sanguínea (*Giménez et al., 2022; OMS, 2020; Villalobos-Sánchez et al., 2022*). La mayoría de las infecciones son asintomáticas o cursan con síntomas leves como fiebre, exantema, cefalea o artralgias (*Lee et al., 2025*). No obstante, la infección puede asociarse con complicaciones neurológicas, como el síndrome de Guillain-Barré (*Duca et al., 2017*). El impacto más alarmante ocurre durante el embarazo, donde la infección puede desencadenar alteraciones graves en el desarrollo fetal, entre ellas la microcefalia (*Lee et al., 2025; Rabe et al., 2025*). Debido a la magnitud de estas complicaciones, la OMS declaró al ZIKV en una emergencia de salud pública de importancia internacional en 2016 (*Wilder-Smith y Osman, 2020*).

A pesar de los avances en la última década, no existe todavía un tratamiento específico ni una vacuna aprobada contra ZIKV. Se han explorado múltiples plataformas vacunales (incluyendo vacunas inactivadas, atenuadas, de ADN, ARNm, vectores virales y péptidos recombinantes) para llevar prototipos de vacunas a ensayos clínicos, resultando en perfiles aceptables de seguridad e inmunogenicidad, sin embargo, para ninguna de estas vacunas se ha completado la evaluación clínica con resultados que permitan su aprobación (*Woodson y Morabito, 2024*). Por lo tanto, continuar con el desarrollo de vacunas contra el ZIKV es una necesidad imperante.

Entre las estrategias para el desarrollo de vacunas, el uso de proteínas multiepitópicas se considera promisorio dado que permite seleccionar epítomos conservados de diferentes proteínas virales y ensamblarlos en un antígeno capaz de estimular simultáneamente respuestas humorales y celulares. Gracias al uso de herramientas inmunoinformáticas, diversos candidatos multiepitópicos contra ZIKV han sido diseñados (*Braz y Batista, 2024; Ezzemani et al., 2023*). Aunque, proteínas como la de envoltura (E) representan blancos inmunogénicos clave (*Chen et al., 2023; Sun et al., 2023*), es importante contar con un antígeno que permita inducir respuestas tanto humorales como celulares contra aquellos epítomos protectores, a la vez que se excluyen los epítomos inmunodominantes que no confieren protección.

En conjunto, este panorama evidencia la urgencia de avanzar en estrategias vacunales innovadoras y fundamenta la pertinencia de estudiar candidatos multiepitópicos como una alternativa para el control del ZIKV.

ANTECEDENTES

I. Virus del Zika

Clasificación taxonómica

El ZIKV se clasifica taxonómicamente dentro de la familia *Flaviviridae* y pertenece al género *Flavivirus* (Tabla 1) (Schoch et al., 2020). Esta clasificación dentro del linaje taxonómico lo relaciona estrechamente con otros flavivirus transmitidos por mosquitos, entre ellos el virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus del Nilo occidental (WNV), el virus del dengue (DENV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV), con los cuales comparte tanto vectores como características genómicas (Van Leur et al., 2021).

Tabla 1.- Clasificación taxonómica del ZIKV

Dominio	Riboviria
Reino	Orthornavirae
Filo	Kitrinoviricota
Clase	Flasuviricetes
Orden	Amarillovirales
Familia	<i>Flaviviridae</i>
Género	<i>Flavivirus</i>
Especie	<i>Zika</i>

Organización génica

El ZIKV es un virus envuelto con un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. Su organización genómica comprende aproximadamente 10.8 kb y consiste en un único marco de lectura abierto (ORF), delimitado en sus extremos por dos regiones no traducibles (UTRs 5' y 3'). Dicho ORF codifica una poliproteína que posteriormente es escindida para generar las proteínas estructurales y no estructurales que conforman el virus (Figura 1) (Ávila-Pérez *et al.*, 2018; Beckham *et al.*, 2016; Bhagat *et al.*, 2021).

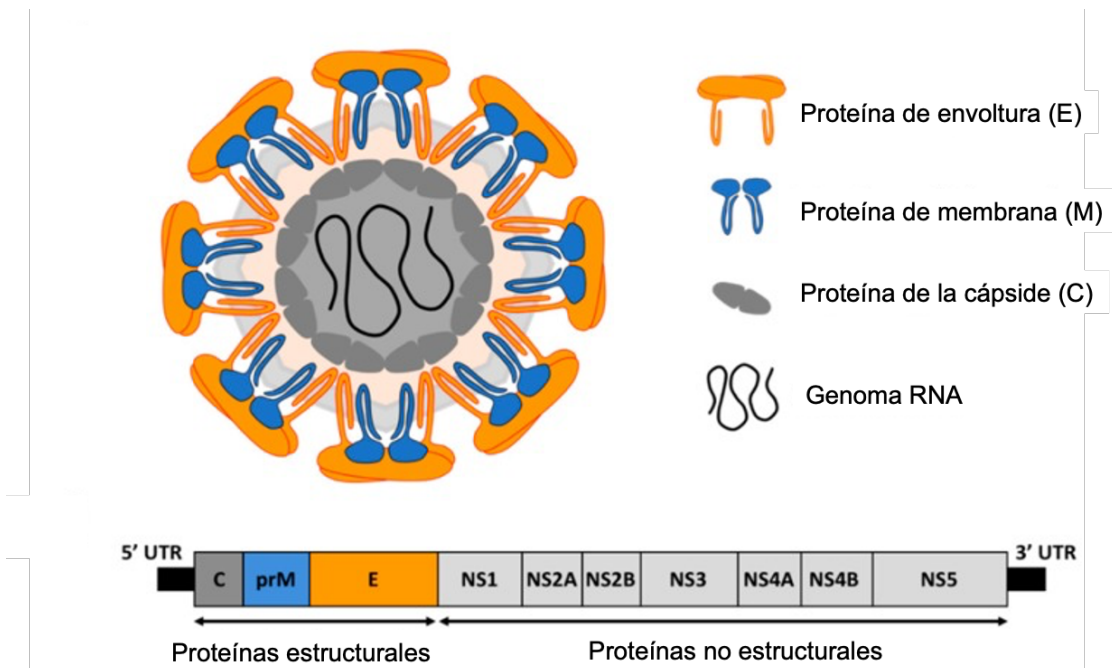


Figura 1. Estructura del virión del ZIKV y organización de su genoma. La superficie viral está compuesta por las proteínas E y M dispuestas con simetría icosaédrica. El genoma de ~10.8 kb se traduce como una poliproteína que posteriormente se escinde en tres proteínas estructurales y siete no estructurales. Las regiones no traducibles 5' y 3' (UTR) se representan con líneas negras, localizadas en los extremos del genoma (modificado de Ávila-Pérez *et al.*, 2018).

Proteínas estructurales y no estructurales

Las proteínas estructurales del ZIKV incluyen la proteína de la cápside (C), la proteína de envoltura (E) y la proteína de membrana (prM/M). Estas participan principalmente en el ensamble de las partículas virales, la adsorción y la entrada del virus a las células huésped, además de contener los principales epítomos neutralizantes (Tabla 2, Figura 2) (Guo *et al.*, 2021; Valente y Moraes, 2017).

Tabla 2. Proteínas estructurales del ZIKV, funciones principales y relevancia.

Proteína estructural	Función principal	Relevancia
Cápside (C) (Zhang <i>et al.</i> , 2021)	• Forma la nucleocápside que empaqueta y protege el genoma viral. • Participa en el ensamblaje del virión dentro del retículo endoplásmico.	• Mutaciones en la proteína pueden afectar la estabilidad del virión y la eficiencia de infección.
Precursora de membrana (prM)/ membrana (M) (Feng, 2024)	• La prM participa en los procesos de ensamblaje, liberación, maduración e infección del virus. • La prM interactúa con la proteína E para crear el precursor de la partícula viral. • Tras maduración, prM se escinde a M.	• La escisión incompleta de prM a M se relaciona con viriones inmaduros.

Envoltura (E) (Feng, 2024; Valente y Moraes, 2017).	• Esencial para la estructura del virión. • Media la unión del virus a receptores celulares. • Facilita la fusión de membranas y la liberación del genoma viral al interior de la célula. • Principal antígeno reconocido por anticuerpos neutralizantes. • Principal antígeno vacunal.
---	--

Por otro lado, las proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5, desempeñan funciones esenciales en la replicación viral y en la modulación de la respuesta inmunitaria del huésped (Tabla 3, Figura 2) (Guo *et al.*, 2021; Valente y Moraes, 2017).

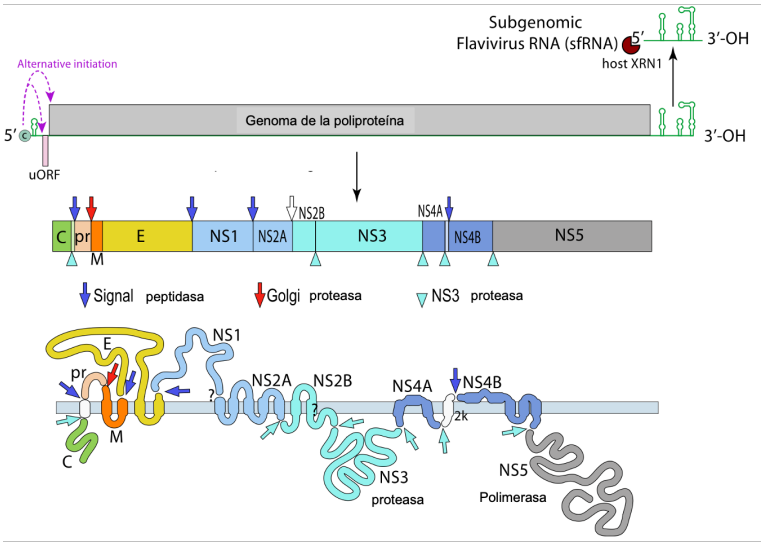


Figura 2.- Organización del genoma de ZIKV y generación de proteínas virales. El genoma codifica una poliproteína escindida en proteínas estructurales que conforman el virión, así como en proteínas no estructurales que coordinan el ensamblaje del complejo de replicación. Se muestran su posición, orientación y sitios de procesamiento (modificado de ViralZone, 2025).

Tabla 3. Proteínas no estructurales del ZIKV, funciones principales y relevancia.

Proteína no estructural	Función principal	Relevancia
NS1 <i>(Valente y Moraes, 2017)</i>	• Participa en la replicación del genoma y en la formación del complejo de replicación.	• Contribuye a la evasión del sistema inmunitario.
NS2A <i>(Zhan et al., 2019)</i>	• Participa en el ensamblaje de la partícula viral.	• Mutaciones en esta proteína afectan la eficiencia de ensamblaje y pueden alterar la infectividad.
NS2B <i>(Kumar et al., 2023)</i>	• Actúa como un cofactor para la actividad catalítica de NS3. • NS2B-NS3 forman un complejo indispensable para escindir la poliproteína en proteínas individuales y funcionales.	• La interrupción del complejo NS2B-NS3 es un objetivo importante en el desarrollo de fármacos antivirales.
NS3 <i>(Zhou et al., 2024)</i>	• NS2B-NS3 forman un complejo indispensable para escindir la poliproteína en proteínas individuales y funcionales.	• Fundamental para la replicación y el procesamiento proteico.

		• Considerado uno de los principales blancos para inhibidores antivirales.
NS4A <i>(Liang et al., 2016)</i>	• Componente del complejo de replicación. • Induce la remodelación de membranas del retículo endoplásmico.	• Algunos estudios la relacionan con efectos en células neuronales (microcefalia).
NS4B <i>(Fanunza et al., 2021)</i>	• Componente del complejo de replicación. • Inhibe la vía de interferón tipo I (IFN-I).	• Su capacidad de bloquear las señales de interferón permite al virus evadir la defensa antiviral del huésped. • Es un blanco terapéutico, ya que su inhibición disminuye la replicación viral.
NS5 <i>(Mwaliko et al., 2020)</i>	• Proteína más grande codificada en el genoma. • Proteína más conservada entre flavivirus.	• Blanco principal para el desarrollo de medicamentos.

Ciclo de infección

El ciclo de infección de ZIKV comienza con la unión del virión a la superficie celular, interacción mediada por la proteína E y los receptores celulares, entre los que se encuentran la molécula de **adhesión** específica de células dendríticas DC-SIGN, los receptores de fosfatidil serina como AXL, la molécula de adhesión celular neuronal NCAM1, la proteína de choque térmico **SP70** y la integrina $\alpha v \beta 5$ (Metzler et al., 2024; Van Leur et al., 2021).

Posteriormente ocurre la endocitosis mediada por clatrina. La acidificación del interior endosomal induce cambios conformacionales en la proteína E que permiten la fusión de la membrana viral con la del endosoma, liberando así el genoma viral al citoplasma (Metzler et al., 2024; Van Leur et al., 2021).

Una vez en el citoplasma, el ARN viral de sentido positivo se traduce en una única poliproteína que después es escindida para generar las proteínas estructurales y no estructurales. De forma paralela, el genoma viral sirve como molde para sintetizar una cadena de ARN de sentido negativo, la cual funciona como plantilla para la producción de nuevos genomas virales (Metzler et al., 2024; Van Leur et al., 2021).

La replicación y el ensamblaje inicial de las partículas virales ocurren en compartimentos derivados del retículo endoplásmico. Durante su tránsito por la red trans-Golgi, el virión experimenta su proceso de maduración. Finalmente, los nuevos viriones son liberados al exterior celular por exocitosis (Metzler et al., 2024; Van Leur et al., 2021).

II. Epidemiología

Brotos históricos de ZIKV

El ZIKV fue aislado por primera vez en 1947 en Uganda. El primer brote en humanos se notificó en 2007 en la Isla Yap, donde aproximadamente el 70% de la población resultó infectada. Posteriormente, en 2013 se registró un brote de gran magnitud en la Polinesia Francesa, que incluyó casos con manifestaciones clínicas graves. No obstante, el brote más significativo se presentó en Brasil en el 2015, afectando a más de 1.5 millones de personas. Ante esta situación, la OMS declaró en 2016 el ZIKV como un problema grave de salud pública a nivel mundial (*Kindhauser et al., 2016*).

Panorama epidemiológico en México

El ZIKV se ha distribuido en 86 países y territorios a nivel mundial, lo que evidencia su amplia expansión a nivel global desde su identificación. En particular, la región de las Américas ha sido una de las más afectadas. En México, durante el periodo comprendido entre 2015 y 2025, la Secretaría de Salud notificó 13,068 casos de infección por ZIKV, de los cuales 7,157 ocurrieron en mujeres embarazadas, un dato relevante debido al riesgo de desarrollar complicaciones congénitas asociadas a la infección durante la gestación (*Secretaría de Salud, 2025*).

Sintomatología

La detección y notificación de casos confirmados de infección por ZIKV son limitadas; cerca del 80% de las infecciones cursan de manera asintomática, mientras que el 20% restante presenta manifestaciones clínicas leves (*Pielnaa et al., 2020*). Los síntomas suelen ser fiebre, cefalea, exantema, conjuntivitis, mialgias, artralgias y enrojecimiento

ocular (Figura 3), con una duración de 2 a 7 días y un período de incubación que oscila entre 3 y 12 días (Slavov *et al.*, 2016). Esta combinación de alta proporción de casos asintomáticos y síntomas inespecíficos dificulta la detección adecuada y monitoreo del ZIKV en la población afectada.



Figura 3. Sintomatología asociada a la infección por ZIKV. Se representan las principales manifestaciones clínicas que aparecen aproximadamente en el 20% de los casos sintomáticos, destacando fiebre, exantema, conjuntivitis, cefalea, mialgias y artralgias (Modificado de Rather *et al.*, 2017).

Complicaciones

Uno de los principales problemas asociados a este patógeno es su relación con el desarrollo de microcefalia en recién nacidos y con el síndrome de Guillain-Barré en adultos, considerados ambas como las complicaciones más graves derivadas de la infección por ZIKV (Javed *et al.*, 2018).

La microcefalia es una alteración del neurodesarrollo caracterizada por un tamaño de

la cabeza menor al esperado para la edad gestacional (Figura 4) (Becerra-Solano et al., 2021). Esta condición resulta de un crecimiento anormal del cerebro durante la gestación, lo que se refleja directamente en un perímetro cefálico reducido al momento del nacimiento (Possas, 2026; Shen et al., 2021).

La microcefalia puede manifestarse como una condición aislada o acompañada de otros defectos congénitos. En el ámbito cognitivo, los niños afectados suelen presentar discapacidad intelectual que limita sus habilidades de aprendizaje. Además, pueden experimentar pérdida auditiva, alteraciones visuales y otras complicaciones neurológicas, como reflejo del impacto que esta condición ejerce sobre el desarrollo del sistema nervioso central (Rather et al., 2017).

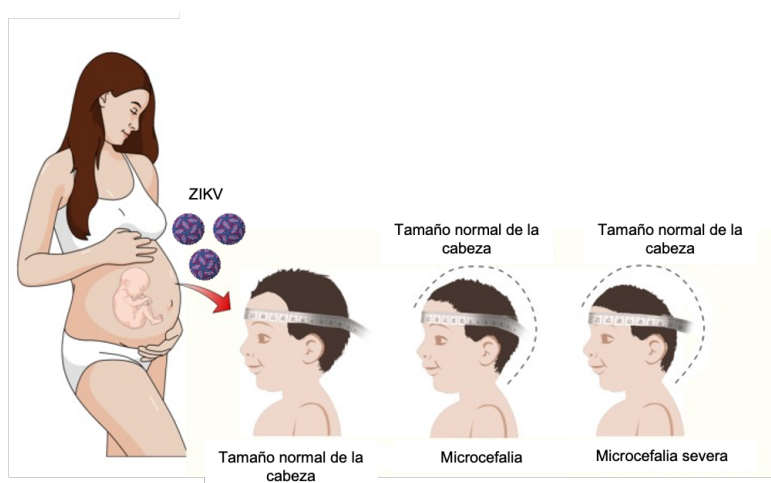


Figura 4. Asociación del ZIKV con la microcefalia durante el embarazo. La infección materna por ZIKV durante la gestación puede conducir a la infección fetal, generar alteraciones en el desarrollo neuronal y dar lugar al desarrollo de microcefalia (modificado de Rather et al., 2017).

Por otra parte, la infección por ZIKV se ha asociado también con el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré, una neuropatía autoinmune que afecta principalmente a adultos y se caracteriza por debilidad muscular progresiva y afectación de los nervios periféricos (Laman et al., 2022).

III. Vías de transmisión

La transmisión del ZIKV ocurre principalmente a través de la picadura del mosquito *Aedes* (Figura 5). Cuando el virus entra en la epidermis o directamente al torrente sanguíneo, los queratinocitos, las células endoteliales y las células dendríticas pueden favorecer su replicación en el sitio de entrada. Asimismo, se ha documentado que los monocitos circulantes pueden infectarse y contribuir a la diseminación viral (*Kazmi et al., 2020*).

Diversos estudios indican que el virus también puede transmitirse por contacto sexual (Figura 5). Se ha reportado que este tipo de transmisión ocurre con mayor frecuencia de hombre a mujer, aunque también puede presentarse de mujer a hombre y de hombre a hombre. Dado que la carga viral es más alta en el semen, se ha observado que el virus puede persistir en esta secreción hasta 414 días después del inicio de los síntomas (*Bujan et al., 2020*). Aunque no se conoce completamente el mecanismo, se plantea la hipótesis de que el ZIKV podría replicarse de manera eficiente en el tracto reproductor masculino (*Khaiboullina et al., 2019; Sá-Guimaraes et al., 2022*).

Se ha documentado la transmisión de una madre infectada al feto durante la gestación (Figura 5). El ZIKV puede atravesar la placenta y alcanzar los tejidos neuronales fetales, provocando graves alteraciones del desarrollo (*Bhardwaj et al., 2021; Winkler et al., 2027*).

Finalmente, la transfusión sanguínea constituye otra vía de transmisión (Figura 5). Un estudio describió un caso confirmado de infección por ZIKV adquirida mediante la transfusión de sangre (*Barjas-Castro et al., 2016*).

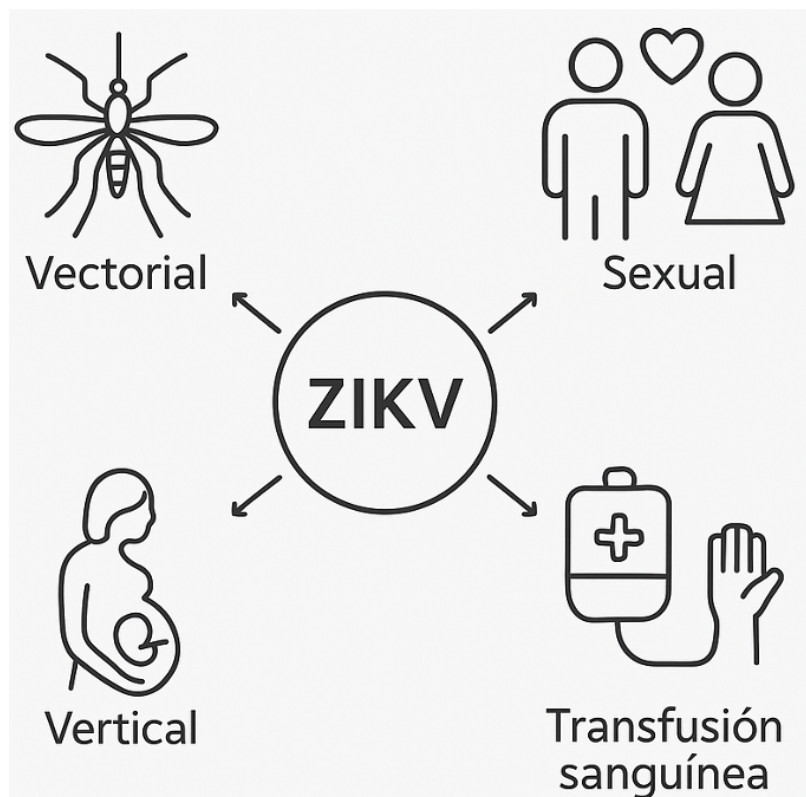


Figura 5. Vías de transmisión del ZIKV. Se muestran las cuatro rutas de transmisión reconocidas: vectorial a través de *Aedes aegypti*, sexual, vertical y por transfusión. Todas estas contribuyen a la propagación del virus en la población humana.

IV. Panorama general de vacunas en desarrollo contra ZIKV

A pesar de que el ZIKV se ha convertido en un problema de salud pública, actualmente no existen tratamientos específicos capaces de interrumpir su ciclo replicativo y las intervenciones disponibles se limitan al alivio de los síntomas (*Javed et al., 2018*).

Los avances en el diseño de vacunas contra otros flavivirus han proporcionado un fundamento sólido para el desarrollo de vacunas contra ZIKV, de modo que la selección de una plataforma vacunal adecuada representa un paso decisivo para

garantizar su seguridad y eficacia (*Poland et al., 2018*). Hasta la fecha, se han propuesto múltiples vacunas basadas en diversas plataformas, de las cuales varias han avanzado a fases tempranas de ensayos clínicos (*Pattnaik et al., 2020*).

La Tabla 4 presenta un panorama general de los candidatos en evaluación clínica, organizados por plataforma y por fase de desarrollo. Con el fin de contextualizar esta información y destacar los avances más relevantes, a continuación, se describen de manera general las características y progresos asociados a cada plataforma vacunal (*Castanha y Marques, 2020; Pattnaik et al., 2020; Wang et al., 2022*)

Vacunas basadas en ácidos nucleicos

Uno de los candidatos vacunales contra ZIKV más avanzados es VRC5283 (VRC-ZKADNA090-00-VP), una vacuna de ADN desarrollada por el Vaccine Research Center del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Esta formulación consiste en plásmidos de ADN que codifican las proteínas prM y E del ZIKV, derivadas de la cepa H/PF/2013. En modelos preclínicos en primates no humanos, VRC5283 indujo anticuerpos neutralizantes y confirió protección durante el embarazo, así como frente a la transmisión vertical del virus (*Pattnaik, 2020; Thomas-Stephen, 2020*). En ensayos clínicos de fase I, la vacuna demostró ser segura y bien tolerada, con eventos adversos principalmente leves a moderados, además de inducir respuestas celulares y humorales robustas. Actualmente, VRC5283 se evalúa en un ensayo internacional de fase II, utilizando un esquema de tres dosis administradas en las semanas 0, 4 y 8 (*Gaudinski et al., 2018; Castanha et al., 2020*).

Moderna ha desarrollado dos vacunas basadas en mRNA (mRNA-1325 y mRNA-1893) que codifican las proteínas prM-E. En estudios preclínicos, mRNA-1325 indujo protección parcial en ratones, aunque en modelos inmunocompetentes requirió una dosis de refuerzo. Su estudio clínico de fase II (NCT03014089) aún no cuenta con

resultados publicados. Por su parte, mRNA-1893 ha completado la fase I en adultos seronegativos y seropositivos a flavivirus (NCT04064905), y se encuentra en evaluación adicional en zonas endémicas y no endémicas (NCT04917861) (*Poland et al., 2019*).

La vacuna de ADN GLS-5700, desarrollado por GeneOne Life Science en colaboración con Inovio Pharmaceuticals, ha sido evaluada en dos ensayos clínicos de fase I. En adultos seronegativos, la administración intradérmica seguida de electroporación fue bien tolerada y generó anticuerpos neutralizantes en ~60% de los participantes; además, los sueros obtenidos confirieron protección en ratones INFAR-/- frente al desafío viral (*Tebas et al., 2021*).

El NIAID también desarrolló las vacunas de ADN VRC5288 y VRC5283. VRC5288 corresponde a una vacuna quimérica que combina secuencias del ZIKV y del virus de la encefalitis japonesa, mientras que VRC se basa en secuencias de ZIKV de tipo silvestre. Ambas vacunas confirieron protección frente a la viremia en modelos de primates no humanos y mostraron un perfil de seguridad favorable en ensayos clínicos de fase I; sin embargo, VRC5283 indujo respuestas humores y celulares de mayor magnitud, particularmente cuando se administró por vía intramuscular mediante un sistema de inyección sin aguja (jet injection) (*Gaudinski, 2018*).

Vacunas basadas en vectores virales

Ad26.ZIKV.001, desarrollada por Janssen, utiliza un adenovirus humano tipo 26 no replicante. Los estudios preclínicos mostraron altos títulos de anticuerpos neutralizantes y protección completa frente a la viremia en ratones y primates no humanos. El candidato está en fase I (NCT03356561) (*Salisch et al., 2021*).

Themis Bioscience desarrolló dos vacunas que emplean el virus del sarampión como vector: MV-ZIKV y MV-ZIKV-RSP. MV-ZIKV indujo respuestas humorales y celulares en ratones IFNAR^{-/-} CD46 y protegió a hembras embarazadas sin causar efectos teratogénicos. Ambos candidatos completaron ensayos de fase I (NCT02996890 y NCT04033068) (Peng et al., 2024; Nürnberger et al., 2019).

La Universidad de Oxford desarrolló ChAdOx1 Zika, basado en un adenovirus de chimpancé con replicación deficiente. Una sola dosis de esta vacuna sin adyuvante protegió completamente a ratones y no indujo anticuerpos facilitadores de la infección por dengue (Camacho et al., 2018). Se han realizado dos estudios de fase I, uno como vacuna independiente (NCT04015648) y otro en coadministración con una vacuna contra Chikungunya (NCT04440774), cuyos resultados de inmunogenicidad aún no son publicados (Builtrago-Pabón, 2024; Peng et al., 2024).

Vacunas inactivadas

La vacuna ZPIV (Zika Purified Inactivated Virus), basada en virus del Zika inactivado y desarrollada por el NIAID y el Beth Israel Deaconess Medical Center (BIDMC), ha mostrado protección completa en ratones y primates no humanos. En la evaluación clínica de fase I, administrada en dos dosis (días 1 y 29), fue bien tolerada y generó seroconversión en 92% de los participantes, cuyos anticuerpos protegieron a modelos animales frente a la viremia. Estudios adicionales evaluaron la vacuna en esquemas acelerados, demostrando que se requieren dos dosis para inducir títulos adecuados, aunque su duración fue limitada. Actualmente esta vacuna se evalúa en Puerto Rico con diferentes dosis (5 y 2.5 µg) (NCT03008122) (Builtrago-Pabón, 2024; Stephenson et al., 2020; Peng et al., 2024).

La vacuna TAK-426, un candidato vacunal basado en ZIKV purificado e inactivado, desarrollada por Takeda Pharmaceutical Company, mostró alta inmunogenicidad en

ratones y protección completa en primates no humanos (*Baldwin et al., 2018; Young et al., 2020*). En un estudio clínico de fase I (NCT03343626), se evaluaron tres niveles de dosis en adultos expuestos y no expuestos a flavivirus. La formulación fue segura e inmunogénica en todos los casos, identificándose 10 µg como la dosis óptima para continuar con su desarrollo (*Acosta et al., 2023; Han et al., 2021*).

Vacunas atenuadas

La vacuna rZKV/D4/Δ30-713, desarrollada por el NIAID, es una vacuna quimérica de virus atenuado que expresa las proteínas prM y E del ZIKV sobre una cepa atenuada del virus del dengue serotipo 4 (DENV-4). El ensayo clínico de fase I (NCT03611946) evaluó su seguridad, reactogenicidad e inmunogenicidad en individuos sin exposición previa a flavivirus. El estudio concluyó en marzo de 2022 y determinó que la formulación fue segura y bien tolerada; sin embargo, indujo niveles bajos de seroconversión, lo que indica una respuesta inmunogénica insuficiente, probablemente debido a una atenuación excesiva del virus recombinante. En conjunto, los resultados indican que rZIKV/D4Δ30-713 está sobreatenuada y no se continuará su desarrollo como candidato vacunal (*Builtrago-Pabón, 2024; Peng et al., 2024*).

Aunque se han desarrollado diversas vacunas contra el ZIKV, ninguna ha sido aprobada debido a limitaciones importantes. Si bien los candidatos basados en ADN y mRNA han mostrado perfiles de seguridad favorables e inducen respuestas humorales y celulares, como se describió previamente, en varios casos la magnitud y duración de dichas respuestas ha sido limitada, requiriendo múltiples dosis de refuerzo o sin progresar más allá de fases tempranas de evaluación clínica. Asimismo, en otros candidatos mencionados, como vacunas inactivadas o atenuadas, se ha observado seroconversión transitoria, protección parcial o respuestas inmunes insuficientes.

Adicionalmente, la similitud antigénica entre ZIKV y otros flavivirus, particularmente el dengue, plantea el riesgo de reactividad cruzada y potenciación dependiente de anticuerpos, lo que representa un desafío para su desarrollo. Finalmente, la seguridad y eficacia en poblaciones vulnerables, como mujeres embarazadas, aún no han sido completamente establecidas. Estas limitaciones evidencian la necesidad de explorar nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas contra ZIKV.

Tabla 4. Panorama general de las vacunas en desarrollo contra el ZIKV en ensayos clínicos

Fase	Plataforma	Candidato	Ensayo clínico	Desarrolladores
II	DNA	VRC5283	NTC03110770	NIAID, VRC, Emmes Leidos Biomedical Research
	mRNA	mRNA-1325	NCT03014089	Moderna
I	mRNA	mRNA-1893	NCT04064905	Moderna
	DNA	GLS-5700	NCT02809443	GeneOne Life Science Inc./ Inovio
			NCT02887482	Pharmaceuticals
		VRC5288	NCT02996461	NIAID, VRC
		VRC5283	NCT02840487	
	Vectores virales	Ad26.ZIKV.001	NCT03356561	Janssen Vaccine and Prevention B. V.
		MV-ZIKA-RSP	NCT04033068	Themis
		MV-ZIKA	NCT02996890	Bioscience GmbH
		ChAdOx1 Zika	NCT04015648 NCT04440774	Universidad de Oxford
	Virus- Atenuado	rZIKV/D4Δ30- 713	NCT03611946	NIAID
	Virus inactivado	Zika Virus	NCT02963909	NIAID/ BIDMC
		Purified	NCT02952833	
		Inactivated	NCT03008122	

I	Vaccine (ZPIV)	NCT02937233	
	Purified		
	Inactivated		
	Zika Virus	NCT03343626	Takeda
	Vaccine (PIZV)		
	TAK-426		
	VLA1601	NCT03425149	Valneva Austria GmbH
	BBV121	NCT04478656	Bharat Biotech
NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases; BIDMC: Beth Israel Deaconess Medical Center; VRC: Vaccine Research Center.			

V. Vacunas multiepitópicas

Las vacunas multiepitópicas son un tipo de vacuna de subunidad basadas en epítomos, las cuales emplean pequeños fragmentos de proteínas o péptidos capaces de desencadenar una respuesta inmune específica y protectora contra un patógeno determinado. Esta estrategia ha sido de gran interés debido a su capacidad para inducir de manera simultánea respuestas humorales y celulares (*Shawan et al., 2023*).

Un enfoque relevante para su desarrollo es la identificación y selección de epítomos protectores mediante herramientas *in silico*, las cuales permiten predecir, evaluar y priorizar regiones antigénicas con alto potencial inmunogénico y protector a la vez que se descartan las regiones inmunodominantes no protectoras (*Yuan et al., 2024*).

La incorporación simultánea de epítomos de células B y T dentro de un mismo constructo multiepitópico favorece la inducción de respuestas inmunes altamente

específicas, protectoras, seguras y duraderas, lo que representa una de las principales ventajas de este tipo de plataforma vacunal (*Allemailem, 2025*).

Diseño

El diseño y desarrollo de vacunas multiepitópicas inicia con la identificación de antígenos objetivo y el análisis detallado de sus secuencias en bases de datos, con el fin de evaluar su potencial inmunogénico (*Rappuoli et al., 2019*). En este proceso, las herramientas computacionales y bioinformáticas desempeñan un papel central, permiten predecir y priorizar epítomos con alta probabilidad de inducir una respuesta inmune eficaz y segura (Figura 6) (*Rappuoli et al., 2019; Shawan et al., 2023*).

La construcción de estas vacunas depende ampliamente de plataformas de predicción de epítomos y de simulaciones de acoplamiento molecular, las cuales facilitan la evaluación de las interacciones entre los epítomos seleccionados y los componentes del sistema inmunitario, predominantemente moléculas MHC. De manera complementaria, el modelado computacional de la respuesta inmune permite anticipar el comportamiento de los constructos vacunales dentro del organismo, simulando su interacción con las células del sistema inmune. Estas aproximaciones *in silico* resultan esenciales para optimizar las formulaciones y realizar una evaluación preliminar de la inmunogenicidad de los candidatos vacunales (figura 6) (*Basmenj et al., 2024; Rappuoli et al., 2019*).

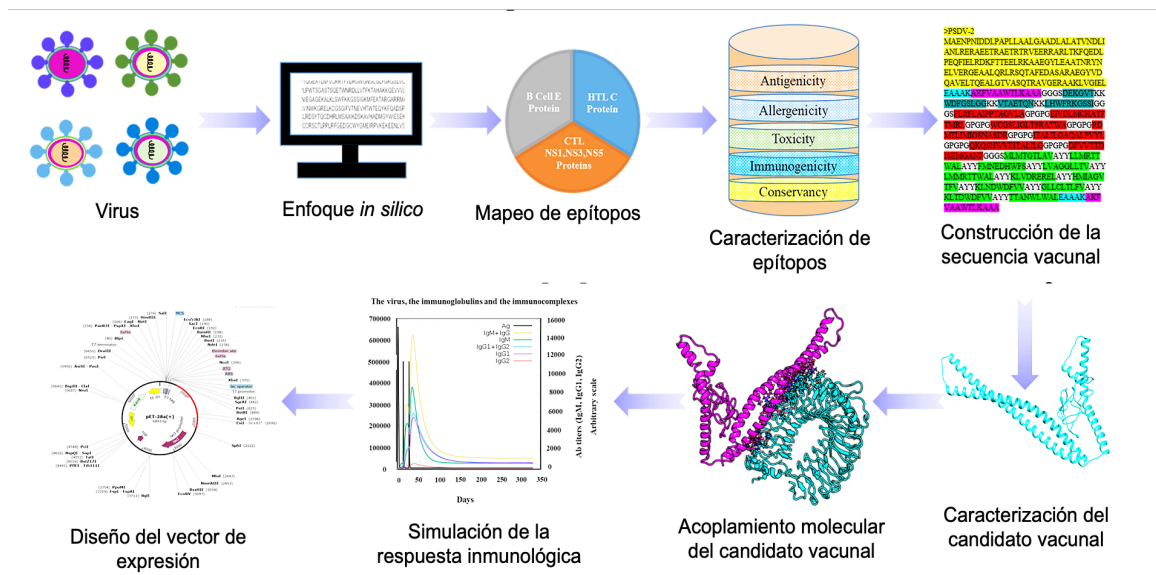


Figura 6. Etapas del diseño de una vacuna multiepitópica basada en herramientas inmunoinformáticas. Incluye la identificación y mapeo de epítomos, la caracterización y selección de epítomos conservados, el ensamblaje del constructo vacunal, el análisis de acoplamientos molecular, la simulación de la respuesta inmune y el diseño del vector para su expresión (modificado de *Ullah et al., 2024*).

Un componente clave en el diseño racional de vacunas multiepitópicas es la selección de epítomos B y T conservados, debido a su capacidad para inducir simultáneamente respuestas humorales y celulares altamente específicas y que cubran a las variantes del virus. Los epítomos B conservados favorecen la generación de anticuerpos dirigidos contra regiones estructuralmente estables del patógeno, mientras que los epítomos T CD4⁺ y CD8⁺ promueven la activación de linfocitos T cooperadores y citotóxicos, fortaleciendo la duración y magnitud de la respuesta inmunitaria (*Sanchez-Trincado et al., 2017*).

En las plataformas multiepitópicas actuales, la integración estratégica de epítomos B, T CD4⁺ y T CD8⁺ dentro de un único constructo quimérico ha mostrado mejorar el equilibrio y la potencia de la respuesta inmunológica. Este beneficio es especialmente

notable cuando los epítomos seleccionados corresponden a regiones funcionalmente esenciales y evolutivamente conservadas, lo que reduce la probabilidad de escape viral y aumenta el potencial de inducir inmunidad cruzada frente a diversas variantes del patógeno (*Dam et al., 2025; Staneková et al., 2010*).

De manera complementaria, la inclusión de proteínas acarreadoras inmunoestimuladoras, como la subunidad B de la toxina lábil de *Escherichia coli* (LTB), ha demostrado potenciar la activación del sistema inmunológico y mejorar la presentación antigénica de los epítomos seleccionados, contribuyendo a generar respuestas inmunes más robustas. Estudios recientes muestran que LTB puede modular células presentadoras de antígeno y facilitar tanto respuestas humorales como celulares cuando se utiliza como adyuvante o fusionado con antígenos en diferentes plataformas vacunales, incluyendo bioconjugados y vacunas recombinantes (*Li et al., 2024; Mayer & Clements, 2016; Xiao et al., 2022; Yu et al., 2019*). No obstante, también se ha reportado que, dependiendo de la vía de administración y del contexto antigénico, LTB puede favorecer la inducción de respuestas reguladoras y de tolerancia inmunológica en modelos murinos, asociándose con la expansión de células T reguladoras CD4⁺ Foxp3⁺ (*Donaldson et al., 2013*). Evidencia adicional sugiere que su uso como adyuvante mejora la inducción de anticuerpos neutralizantes y la activación de la respuesta adaptativa, tanto sistémica como mucosa, en modelos animales (*Smith & Roberts, 2008*).

En conjunto, estos hallazgos indican que el efecto de LTB depende del contexto en el que se emplee, por lo que su formulación y vía de administración deben seleccionarse cuidadosamente para favorecer la respuesta inmune deseada. En este sentido, la identificación y selección de epítomos conservados cobra especial relevancia, ya que permiten dirigir dicha respuesta hacia regiones virales funcionalmente importantes y menos variables. De esta manera, los epítomos conservados constituyen un elemento esencial para el desarrollo de vacunas de nueva generación con mayor especificidad, estabilidad y eficacia inmunológica. Esto sustenta la importancia de considerar

estrategias vacunales que integren epítomos conservados y componentes inmunoestimuladores.

Sistema de expresión

Las bacterias representan una plataforma accesible y eficiente para la expresión de proteínas recombinantes, y entre ellas *Escherichia coli* es el sistema de expresión más utilizado. Su rápida tasa de crecimiento, la facilidad para alcanzar cultivos de alta densidad celular, los bajos costos de producción, así como la amplia disponibilidad de herramientas genéticas y cepas optimizadas, la convierten en un huésped adecuado para la producción a gran escala de proteínas con aplicaciones clínicas, incluidos los antígenos vacunales (De Pinho-Favoro et al., 2022; Huang et al., 2017; Rosano y Ceccarelli, 2014).

No obstante, un desafío recurrente en esta plataforma es la tendencia de ciertas proteínas recombinantes a formar agregados insolubles que se acumulan como cuerpos de inclusión, lo cual puede comprometer su solubilidad, correcto plegamiento y funcionalidad (Rinas et al., 2017; Rosano y Ceccarelli, 2014).

Asimismo, se ha documentado que *E. coli* ha sido empleada como sistema de expresión en tres vacunas recombinantes aprobadas para uso humano: Hecolin, Bexsero y Cecolin, dirigidas contra el virus de la Hepatitis E, *Neisseria meningitidis* y el virus del Papiloma Humano, respectivamente (De Pinho-Favoro et al., 2022; Huang et al., 2017).

Por lo tanto, *E. coli* constituye una plataforma eficiente y económica para la expresión de antígenos multiepitópicos recombinantes, lo que permite obtener con rapidez los antígenos recombinantes diseñados *in silico* y avanzar hacia su evaluación inmunológica.

Vacunas multiepitópicas reportadas contra ZIKV

Diversos estudios han aplicado enfoques inmunoinformáticos para el diseño de vacunas multiepitópicas contra el ZIKV, con énfasis en la identificación, priorización y ensamblaje racional de epítomos B y T, complementados con análisis estructurales y de reconocimiento inmunológico.

El trabajo de Prasasty y colaboradores se basó en el desarrollo de un candidato vacunal multiepitópico mediante la identificación *in silico* de epítomos T y B prometedores, empleando predicciones de antigenicidad y análisis de interacción péptido-HLA. El constructo mostró interacciones favorables en estudios de docking molecular (Prasasty *et al.*, 2019).

De manera similar, Antonelli y colegas diseñaron un constructo compuesto por epítomos T CD4⁺ y CD8⁺, complementado con el dominio III de la proteína E (EDIII) para potenciar la respuesta humoral. Sus análisis predijeron una cobertura poblacional amplia y una capacidad potencial de inducir respuestas celulares y humorales (Antonelli *et al.*, 2022).

Por su parte, Braz y Batista (2024) identificaron epítomos T CD8⁺ y epítomos de células B conservados, no tóxicos e inmunogénicos provenientes del proteoma del ZIKV. El diseño incluyó linkers apropiados y un adyuvante, además del análisis del constructo mediante acoplamiento molecular con TLR3 y TLR8.

En otro estudio, Alharbi y colaboradores (2024) desarrollaron un constructo multiepitópico utilizando criterios inmunoinformáticos estrictos para seleccionar epítomos no alergénicos y no tóxicos. El ensamblaje incluyó linkers optimizados y se evaluó su interacción inmunitaria mediante docking molecular y simulación dinámica, prediciéndose su capacidad para inducir respuestas humorales y celulares.

Hasta el momento, todos estos candidatos sólo fueron validados *in silico*, por lo que la

falta de estudios preclínicos evidencia una brecha significativa entre el diseño computacional y el desarrollo experimental, lo que subraya la necesidad de avanzar hacia la expresión recombinante, purificación y evaluación inmunológica de candidatos multiepitópicos contra ZIKV.

En contraste, otras plataformas vacunales contra ZIKV, como vacunas de ADN, ARNm, proteínas recombinantes e incluso formulaciones inactivadas, sí han sido evaluadas en modelos murinos y han demostrado generar respuestas inmunogénicas robustas, aunque sin incorporar un enfoque multiepitópico basado en el diseño racional (*Kim et al., 2024; Lee et al., 2025; Sintara, 2025; Teixeira et al., 2024*).

VI. Respuesta inmune frente al ZIKV

Inmunidad humoral y anticuerpos neutralizantes

La proteína E del ZIKV es el principal antígeno estructural capaz de inducir inmunidad protectora, ya que media la unión del virus a los receptores celulares y participa en los procesos de ensamblaje y fusión de membranas. Debido a su papel central en la entrada viral, representa el blanco predominante de los anticuerpos neutralizantes generados durante la infección (*Elliott y Mattapallil, 2024; Robbiani et al., 2017*).

Sin embargo, en el contexto de flavivirus, la inducción de anticuerpos contra la proteína E también puede asociarse con el fenómeno conocido como antibody-dependent enhancement (ADE), en el cual los anticuerpos no neutralizantes o subneutralizantes facilitan la entrada viral a células que expresan receptores Fcγ, como monocitos, macrófagos y células dendríticas, incrementando la infección y la replicación viral. Este mecanismo ha sido ampliamente documentado para el virus del dengue y representa una preocupación relevante para el ZIKV debido a su alta similitud estructural y antigénica entre ambos virus, lo que favorece respuestas humorales cruzadas con capacidad neutralizante limitada (*Dejnirattisai et al., 2016; Katzelnick et al., 2020; Dai et al., 2022; Tsai et al., 2024*).

La proteína E se organiza en tres dominios estructurales:

Dominio I (EDI): funciona como región de bisagra que facilita los cambios conformacionales de la proteína E y contiene principalmente epítomos tipo-específicos no neutralizantes (*Crill et al., 2001; Elliott y Mattapallil, 2024; Robbiani et al., 2017*).

Dominio II (EDII): conforma la región de dimerización e interviene directamente en la fusión de membrana, además, alberga múltiples epítomos altamente conservados

entre flavivirus, los cuales inducen anticuerpos con elevada reactividad cruzada (*Crill et al., 2001; Elliott y Mattapallil, 2024; Robbiani et al., 2017*). Diversos estudios han demostrado que los anticuerpos dirigidos contra estas regiones conservadas suelen presentar una capacidad neutralizante limitada y se asocian con el ADE en infecciones cruzadas entre el dengue y ZIKV, lo que representa un riesgo potencial para el desarrollo de vacunas basadas en la proteína E completa (*Stettler et al., 2016; Dai et al., 2022*).

Dominio III (EDIII): presenta un pliegue tipo inmunoglobulina y contiene los bucles más expuestos en la superficie del virión. Este dominio se ha asociado con anticuerpos altamente neutralizantes y predominantemente tipo-específicos, con una menor reactividad cruzada frente a otros flavivirus, al incluir determinantes antigénicos directamente relacionados con la unión del virus a las células blanco (*Crill et al., 2001; Elliott y Mattapallil, 2024; Robbiani et al., 2017*). En contraste con los dominios I y II, los anticuerpos dirigidos contra EDIII muestran un menor potencial de inducir ADE, lo que convierte esta región en un blanco antigénico atractivo desde el punto de vista de seguridad inmunológica (*Tai et al., 2018; Chen et al., 2023*).

En conjunto, estas características han convertido al EDIII en un componente clave en el diseño racional de vacunas contra ZIKV, incluidos los constructos multiepítopicos, al permitir dirigir la respuesta humoral hacia epítopos neutralizantes tipo-específicos capaces de inducir una neutralización eficaz, minimizando al mismo tiempo la generación de anticuerpos cruzados no neutralizantes asociados con el fenómeno de ADE, especialmente en regiones endémicas donde cocirculan múltiples flavivirus.

Inmunidad celular

La inmunidad mediada por células T es esencial para controlar el ZIKV y eliminar las células infectadas. Durante la infección, se generan respuestas robustas de células CD8⁺, principalmente dirigidas contra proteínas no estructurales del virus. En estudios con primates no humanos, la activación de células T se asoció con una reducción significativa de la carga viral en sangre, lo que indicó que tanto las células CD4⁺ como CD8⁺ ayudan a controlar la replicación viral (*Dudley et al., 2016*).

En modelos murinos, las células CD8⁺ se expanden tras la infección y desempeñan un papel clave en la protección. Estas células presentan actividad citotóxica y expresan marcadores como CD107a y granzima B (*Elong Ngono et al., 2017; Pardy et al., 2017; Winkler et al., 2017; Elong Ngono & Shresta, 2018*). Estudios adicionales han demostrado que la respuesta de memoria CD8⁺ contribuye a la protección a largo plazo (*Elong Ngono et al., 2020*).

Las células CD4⁺ también desempeñan un papel importante, al favorecer la producción de anticuerpos neutralizantes y la liberación de citocinas antivirales. En ratones, se ha observado que las células CD4⁺ de tipo Th1 participan en la protección contra ZIKV y proliferan en respuesta a la infección. Sin embargo, aún se desconoce con precisión cómo los subtipos específicos, como las células T foliculares colaboradoras (Tfh) o las células T reguladoras (Treg), contribuyen a la defensa frente al virus (*Elong Ngono et al., 2019; Pardy et al., 2017; Winkler et al., 2017*).

Estos hallazgos muestran que la incorporación de epítopos T inmunodominantes en vacunas multiepitópicas podría inducir respuestas celulares efectivas, duraderas y protectoras contra ZIKV

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el ZIKV continúa representando un problema relevante para la salud pública a nivel mundial, los esfuerzos por desarrollar una vacuna eficaz no han tenido éxito. De hecho, la mayoría de los candidatos vacunales evaluados hasta la fecha han avanzado únicamente hasta etapas preclínicas o clínicas tempranas, debido en parte a limitaciones para inducir respuestas humorales y celulares suficientemente robustas, duraderas y funcionales, las cuales son esenciales para conferir una protección eficaz frente a la infección. En este sentido, la ausencia de prototipos evaluados a nivel preclínico de forma sistemática indica la necesidad de explorar estrategias alternativas que permitan avanzar hacia el desarrollo de vacunas seguras y efectivas contra el ZIKV.

En este contexto, el desarrollo de vacunas multiepitópicas representa una alternativa prometedora, ya que permite la selección racional de epítomos de células B y T con potencial para inducir respuestas inmunes robustas, protectoras y seguras, superando algunas de las limitaciones observadas con otras plataformas vacunales. Adicionalmente, bajo este enfoque se puede prestar atención a la exclusión de regiones antigénicas asociadas al fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos (ADE), reduciendo la reactividad cruzada entre flavivirus, dando lugar a vacunas más seguras. En paralelo, la incorporación de la subunidad B de la toxina lábil de *E. coli* (LTB) como proteína acarreadora se fundamenta en su capacidad inmunoestimuladora, la cual favorece la activación del sistema inmunológico y la presentación antigénica, potenciando así la respuesta inmune frente a los epítomos seleccionados. De manera complementaria, la elección de un sistema de expresión bacteriano ampliamente caracterizado, de bajo costo, alta reproducibilidad y fácil escalamiento, permite la obtención eficiente de proteínas recombinantes para su evaluación funcional e inmunológica en modelos experimentales, facilitando su análisis a nivel preclínico.

En conjunto, la estrategia de vacunación basada en proteínas multiepitópicas contra el ZIKV ofrece el potencial de inducir respuestas inmunes protectoras y seguras. Durante el desarrollo de este tipo de vacunas es indispensable no sólo evaluar la respuesta humoral en términos de anticuerpos específicos que reconocen a los antígenos blanco, sino determinar su funcionalidad *in vitro* e *in vivo* mediante ensayos de sero neutralización y de reto infeccioso, respectivamente. En particular, se requiere ampliar el uso de modelos de ratón no transgénicos que permitan de una forma asequible realizar la evaluación inicial de inmunoprotección sin requerir una infraestructura avanzada, contribuyendo así a la consolidación de modelos para evaluar candidatos vacunales contra el ZIKV.

HIPÓTESIS

El diseño racional de una proteína quimérica basada en múltiples epítomos de la proteína E del ZIKV, que incorpora LTB como proteína acarreadora y conectores adecuados, permitirá la obtención del antígeno recombinante (rpZDIII) expresado eficientemente en un sistema bacteriano (*E. coli*) y tendrá la capacidad de inducir en modelos murinos respuestas inmunes específicas tanto humorales como celulares, caracterizadas por la producción de anticuerpos IgG con capacidad neutralizante; así como protección contra un reto infeccioso en la descendencia (neonatos).

OBJETIVOS

General

Diseñar y producir en *E. coli* la proteína quimérica rpZDIII, basada en secuencias antigénicas de la proteína E del ZIKV y evaluar su potencial inmunogénico, en términos de la inducción de respuestas celulares y humores, determinando la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes, así como proteger contra un reto infeccioso a la descendencia (nenonatos).

Específicos

1. Diseñar *in silico* una proteína quimérica rpZDIII basada en el dominio III y epítopos de células B y T de la proteína E del ZIKV, incorporando la subunidad B de la toxina lábil de *E. coli* y conectores adecuados.
2. Seleccionar y obtener un vector de expresión funcional en *E. coli* que contenga el gen codificante del antígeno rpZDIII.
3. Establecer y evaluar las condiciones de expresión y purificación que permitan la producción eficiente del antígeno rpZDIII en *E. coli* recombinante.
4. Evaluar la inmunogenicidad del antígeno rpZDIII en un modelo murino BALB/c en términos de la inducción de respuestas humores y celulares tras un esquema de inmunización subcutánea.

5. Determinar si los anticuerpos inducidos por rpZDIII tienen actividad neutralizante *in vitro* contra ZIKV.

6. Evaluar el efecto inmunoprotector *in vivo* del antígeno rpZDIII mediante un modelo murino C57BL/6 de desafío viral en neonatos para estimar el potencial para prevenir la transmisión vertical.

ARTÍCULO 1

Rational design and production of a chimeric antigen targeting Zika virus that induces neutralizing antibodies in mice

Arleth Miranda-López¹, Omar González-Ortega^{1,2}, Dania O. Govea-Alonso², Mauricio Comas-García^{3,4*}, Sergio Rosales-Mendoza^{1,2*}

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, SLP, 78210, México

²Sección de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª. Sección, San Luis Potosí, 78210, México

³Sección de Microscopía de Alta Resolución, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª. Sección, San Luis Potosí, 78210, México

⁴Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Parque Chapultepec 1570, 78210 San Luis, S.L.P., San Luis Potosí, 78210, México

***Authors for correspondence**

Sergio Rosales-Mendoza

E-mail: rosales.s@uaslp.mx

Mauricio Comas-García

E-mail: mauricio.comas@uaslp.mx

Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina

Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª. Sección, San Luis Potosí, 78210, México

Abstract

The Zika virus (ZIKV) is considered a public health problem worldwide due to its association with the development of microcephaly and the Guillain-Barré syndrome. Currently, there is no specific treatment or vaccine approved to combat this disease, and thus, developing safe and effective vaccines is a relevant goal. In this study, a multi-epitope protein called rpZDIII was designed based on a series of ZIKV antigenic sequences, a bacterial carrier, and linkers. The analysis of the predicted 3D structure of the rpZDIII chimeric antigen was performed on the AlphaFold 2 server, and it was produced in *E. coli* and purified from inclusion bodies, followed by solubilization and refolding processes. The yield achieved for rpZDIII was 11 mg/L in terms of pure soluble recombinant protein per liter of fermentation. rpZDIII was deemed immunogenic since it induced serum IgG and IgM responses in mice upon subcutaneous immunization in a three-dose scheme. Moreover, sera from mice immunized with rpZDIII showed neutralizing activity against ZIKV. Therefore, this study reveals rpZDIII as a promising immunogen for the development of a rationally designed multi-epitope vaccine against ZIKV, and completion of its preclinical evaluation is guaranteed.

Key words:

Zika fever disease, multi-epitope vaccine, chimeric antigen, humoral response, neutralizing antibodies

1. INTRODUCTION

The Zika virus (ZIKV) belongs to the Flaviviridae family and is the causal agent of Zika Fever or Zika virus disease (*Musso & Gubler, 2016*). The ZIKV was first isolated in 1947 from a Macaque in the Zika Forest of Uganda and remained confined to the African continent for most of the XX century (*Dick et al., 1952*).

In 2016, the World Health Organization declared the Brazil Zika fever epidemic a Public Health Emergency of International concern (*WHO, 2023*). According to the latest epidemiological update (February 2022), infections caused by this virus have been documented in 89 countries and territories distributed in five of the six WHO regions: Africa, Europe, Southeast Asia, Western Pacific, and the Americas (*Pielnaa et al., 2020; WHO, 2022*).

Despite the epidemiological data, the detection and notification of confirmed cases is limited; approximately 80% of infections are asymptomatic, and 20% have mild manifestations (*Pielnaa et al., 2020*).

The main transmission of ZIKV, like for most flaviviruses, is through arthropods vectors of the genus *Aedes*. Nonetheless, this virus poses a unique threat to human health as it can be transmitted through blood transfusions, infected bodily fluids (e.g., urine and tears), sexual contact, and vertically from the mother to the fetus (*Baud et al., 2017; Sharma & Lal, 2027*).

The symptoms of the Zika virus disease last 2-7 days, and the incubation period ranges from 3-12 days (*Poland et al., 2018*). The most common symptoms of the Zika virus disease are fever, red eyes, joint pain, headache, and maculopapular rash (*Lozier et al., 2018*). Moreover, the Asian strain can cause a series of congenital abnormalities (*Lazear & Diamond, 2016*), such as microcephaly (*Rasmussen et al., 2016*) and Guillain-Barré syndrome (*Krauer et al., 2017*).

ZIKV is an enveloped icosahedral virus with positive single-stranded RNA of approximately 11 kb. The virion has a diameter of 50-60 nm and contains the 240 copies of the C, prM, and E proteins, and one copy of the genomic RNA. Its genome encodes for a polyprotein that gives rise to three structural proteins (proteins C, prM, and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5 proteins) (*Javed et al., 2018*), which are cleaved by viral and host-cell proteases. The NS1 and envelope E proteins are the main targets for the induction of protective immune responses (*Rong et al., 2022*).

Although ZIKV has become a global public health concern, there are currently no specific treatments to interrupt the viral cycle; all treatments have focused on ameliorating symptoms (*Javed et al., 2018*).

Since the 2015-2016 outbreak in Brazil, the struggle to discover a therapeutic and/or prophylactic treatment against this pathogen has led research groups around the world to join efforts to combat the infection. Research and development of vaccine candidates against ZIKV include a variety of platforms: live attenuated vaccines, inactivated vaccines, nucleic acids, viral vectors, and virus-like particles (*Pattnaik et al., 2020*).

Promising results have been obtained in murine and non-human primate models in terms of generating robust protection against ZIKV. Thus, vaccination appears feasible for disease prevention (*Vannice et al., 2019*).

However, expanding the repertoire of vaccine candidates is still needed to address relevant aspects that will increase the feasibility of adopting them for massive immunization, especially in developing countries, in terms of low cost of production, a rational design that ensures safety and efficacy, and alternative administration routes that could result in friendly-to-administer vaccines.

In this regard, the design of multiepitope, chimeric proteins offer a rational approach for vaccine development, allowing to (i) focus the immune response on the protective epitopes, (ii) avoid the induction of irrelevant immune responses by skipping the immunodominant, non-protective epitopes, (iii) discard sequences associated with adverse immune reactions (*Akbari et al., 2023; Kardani et al., 2020*).

Considering that the Dengue virus (DENV) is closely related to ZIKV, vaccine design against the latter should consider the fact that co-infections or sequential infections are highly probable (*Carrillo-Hernández et al., 2018; Dejnirattisai et al., 2016; Stettler et al., 2026*). Moreover, antibody-dependent enhancement (ADE) phenomena have been reported for Dengue, which is triggered by E- and prM-specific antibodies that weakly bind to the virus and fail to neutralize the viral particle. This, in turn, leads to an enhanced cell entry by Fc receptor-expressing cells (*Dejnirattisai et al., 2016; Vatti et al., 2017*).

Dejnirattisai and co-workers showed that plasma from previously infected children with DENV cross-react with the Asian and African strains of ZIKV (*Dejnirattisai et al., 2016*) and that the DENV antibodies present in these individuals do not efficiently neutralize ZIKV. They also found, by using the U937 cell line, which is poorly permissive to ZIKV in the absence of ADE, that preincubation of ZIKV with serum of DENV convalescent subjects greatly enhances ZIKV infection. Furthermore, they found similar results when using monoclonal antibodies (mAb) to DENV to promote ADE of infection of U937 cells by ZIKV. This phenomenon is caused by DENV domains I and II (*Slon et al., 2017*), as well as for amino acids 5, 6, 7, and 16 of the pr protein of DENV-4. In contrast, the E domain III (DEIII) has not been associated with ADE induction and has the ability to trigger neutralizing antibodies (*Cui et al., 2021*). Therefore, DEIII is an attractive target for pursuing the rational design of vaccines against ZIKV.

In the present study, a chimeric protein (called rpZDIII) based on the subunit B of the heat-labile enterotoxin (LTB) produced by enterotoxigenic *E. coli* and several target antigens from ZIKV, including EDIII (ZEDIII), was designed and produced in recombinant *E. coli*, as a potential antigen for vaccine development against ZIKV. The expression, purification, and characterization of the rpZDIII antigen were performed; moreover, the immunogenic properties of rpZDIII were assessed in test mice regarding the induction of a neutralizing humoral response.

In conclusion, the antigen produced in the present study stands as a promising immunogen for vaccine development against Zika fever disease, given the established production method that represents a cost-effective one for generating a vaccine under chromatography-free downstream processing with attractive yields and rendering an immunogenic chimera capable of inducing anti-ZIKV neutralizing antibodies.

CRedit authorship contribution statement

Arleth Miranda-López: Writing-original draft, Methodology, Investigation, Data curation. **Omar González-Ortega:** Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Dania O. Govea-Alonso:** Methodology, Data curation. **Mauricio Comas-García:** Writing- review & editing, Conceptualization, Formal analysis, Project administration, Validation. **Sergio Rosales-Mendoza:** Writing- review & editing, Validation, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: [Sergio Rosales-Mendoza reports financial support was provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mx].

Data availability

Data will be made available on request

Acknowledgements

This research was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México (grant numbers 848290 and 321364). Authors thank Dr. Claudia Castillo Martín del Campo, and Dr. Edson Ivan Rubio Hernández by their advice during PRNT₅₀ technique standardization.

ARTÍCULO 2

The rpZDIII vaccine against Zika virus has protective effects in mice

Arleth Miranda-López^{1,3}, Claudia G. Castillo-Martin del Campo², Omar González-Ortega¹, Andrea Romero-Maldonado³, Mauricio Comas-García^{4,5*}, Sergio Rosales-Mendoza^{1,3*}

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, SLP, 78210, México

²Laboratorio de Células Neurales Troncales Humanas, Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª. Sección, San Luis Potosí, 78210, México

³Sección de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª. Sección, San Luis Potosí, 78210, México

⁴Sección de Microscopía de Alta Resolución, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª. Sección, San Luis Potosí, 78210, México

⁵Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Parque Chapultepec 1570, 78210 San Luis, S.L.P., San Luis Potosí, 78210, México

*Authors for correspondence

Sergio Rosales-Mendoza

E-mail: rosales.s@uaslp.mx

Mauricio Comas-García

E-mail: mauricio.comas@uaslp.mx

Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina

Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª. Sección, San Luis Potosí, 78210, México

Abstract

Zika virus (ZIKV) infection is a significant public health concern, associated with serious complications such as Guillain-Barré syndrome and microcephaly. Although several ZIKV vaccine candidates are in various stages of development, none have yet been approved for use in humans. Previously, the rpZDIII ZIKV vaccine candidate was developed and shown to elicit ZIKV-neutralizing antibodies in BALB/c mice. In this study, the protective effects of rpZDIII were evaluated in newborn C57BL/6 mice born to mothers vaccinated under a three-dose regimen. The vaccine induced IgG responses in the mothers that recognized the full-length E protein. Upon viral challenge, 80% of the vaccinated newborns survived, displaying progressive weight gain and normal clinical appearance throughout the observation period. In contrast, offspring from unvaccinated mothers had a 0% survival rate. Furthermore, viral RNA was undetectable in the brain tissue of newborns from vaccinated mothers, whereas high viral loads were observed in those from unvaccinated mothers. These findings demonstrate the *in vivo* protective efficacy of the rpZDIII vaccine and support its continued preclinical development as a promising ZIKV vaccine candidate.

Keywords: humoral response, viral challenge, protective immunity, chimeric antigen, immunocompetent mice

1. Introduction

In recent years, Zika virus (ZIKV) has emerged as a public health problem of international importance. According to the World Health Organization (WHO), cases have been reported in approximately 100 territories and countries worldwide (*Yang et al., 2023*). ZIKV has a positive-sense single-stranded RNA genome encoding a polyprotein, which is divided into three structural proteins: capsid (C), precursor/membrane (pr/M) and envelope (E); and seven nonstructural proteins: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (*Huang et al., 2023; Lefèvre et al., 2024*).

In general, infection has been associated mainly with the development of Guillain-Barré syndrome in adults and microcephaly in newborns (*Giraldo et al., 2023; Tajik et al., 2024*). ZIKV can infect a wide variety of tissue and cell types, the main routes of infection include skin cells (e.g., dermal fibroblasts, epidermal keratinocytes, dendritic cells, and Langerhans cells), placenta cells, (e.g., Hofbauer cells, trophoblasts and endothelial cells), neuronal cells (e.g., embryonic cortical neural progenitor cells (hNPCs), mature neurons, radial glial cells, and astrocytes), and reproductive tract cells (e.g., Sertoli cells, Leydig cells, vaginal epithelial cells, and uterine fibroblasts) (*Clancy et al., 2018; Eder et al., 2023; Tang et al., 2026; Wu et al., 2024*).

Pregnant women are particularly vulnerable to ZIKV infection, especially during the first trimester of gestation (*Carrera et al., 2021*), which can lead to complications, such as intrauterine growth retardation, spontaneous abortion, and microcephaly in newborns (*Wu et al., 2024*). Microcephaly is characterized by an abnormally small head circumference, neural progenitor cells become infected and can generate alterations in their proliferation and differentiation, resulting in brain growth retardation (*Metzler et al., 2024*). ZIKV is the only flavivirus that crosses the placental barrier to reach the fetus and infect placental cells; in fact, it has been shown that the most severe cases of fetal damage occur in the first months of gestation (*Carrera et al., 2021; Metzler et al., 2024; Komarasamy et al., 2022*).

Several candidate vaccines against ZIKV are in various stages of development, with some in preclinical trials and others in clinical trials (*Peng et al., 2024*); however, despite international efforts, there is still no approved vaccine to prevent ZIKV infection. Therefore, developing an effective vaccine is critical not only to stop the transmission but also to protect the most vulnerable population. In fact, several murine models have been designed to understand the Zika virus pathogenesis, which have served as a key tool for this purpose (*Ruiz et al., 2017*). Additionally, these models have facilitated the study of neurological disorders, prenatal complications during pregnancy, and the mechanism of infection (*Caine et al., 2018*).

On the one hand, immunocompromised mice have a weakened immune system, either by genetic manipulation or by some treatment that suppresses some pathway of the immune response (*Pena et al., 2018*), these models present high levels of viremia and signs of disease, which allows to know the behavior of the virus, the progression of the disease and the mechanisms of infection (*Lazear et al., 2016; Johnson et al., 2020*). For example, interferon receptor (IFN)-deficient mice, including A129 mice (IFN α/β) (*Xie et al., 2018*), AG129 mice (IFN $\alpha/\beta/\gamma$ R $^{-/-}$) (*Duggal et al., 2018*), C57BL/6 mice (Ifnar1 $^{-/-}$) (*Jurado et al., 2018*), LysMCre $^{+}$ IFNAR $^{fl/fl}$ C57BL/6 mice (*Tang et al., 2016*), and C57BL/6 + anti-Ifnar1 mAb mice (MAR1-5A3) (*Sapparapu et al., 2016*). Additionally, they have been utilized to assess the potential of certain vaccines and antiviral therapies against ZIKV (*Balint et al., 2021; Emanuel et al., 2018*).

On the other hand, immunocompetent adult mice have a functional immune system, exhibit low susceptibility to viral infection, and do not develop symptoms similar to those observed in virus-infected humans (*Lazear et al., 2016; Pena et al., 2018*). Wild-type BALB/c and C57BL/6 mice have been used to study and understand the innate and adaptive immune responses elicited by infection, as well as the role of the antibody response in protection against Zika virus (*Nazerai et al., 2018*).

Although the C57BL/6 strain exhibits low susceptibility to Zika infection in adult mice, newborn C57BL/6 mice have emerged as a suitable model for studying the mechanism of infection. Their immature immune system facilitates the study of microcephalia and pathogenesis (Yu *et al.*, 2017).

Previously, the design, production, and evaluation of a multi-epitope vaccine called rpZDIII was reported, showing its ability to induce neutralizing antibodies in BALB/c mice (Miranda-López *et al.*, 2024); however, to advance in the preclinical evaluation of this vaccine candidate, the protective effects *in vivo* should be assessed. Herein, newborn C57BL/6 mice were adopted as a model of passive protection of newborns from infection.

Nonetheless, this study confirms the *in vivo* protective efficacy of the rpZDIII vaccine, the transmission of protective antibodies to the fetus, and provides strong support for its continued advancement in preclinical development as a promising candidate for ZIKV vaccination in developing countries given its rapid and cost-effective expression and industrial scalability.

CRedit authorship contribution statement

Arleth Miranda-López: Writing-original draft, Methodology, Investigation, Data curation. **Claudia G. Castillo-Martín del Campo:** Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Andrea Romero-Maldonado:** Methodology, Data curation. **Omar González-Ortega:** Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Mauricio Comas-García:** Writing- review & editing, Conceptualization, Formal analysis, Project administration, Validation. **Sergio Rosales-Mendoza:** Writing- review & editing, Validation, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Sergio Rosales-Mendoza reports financial support was provided by Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, Mx.

Acknowledgements

We thank Lourdes Betancourt-Mendiola for her technical help.

CONCLUSIONES

En este trabajo se diseñó, produjo y evaluó una proteína multiepitópica recombinante (rpZDIII) basada en secuencias antigénicas de ZIKV, cuyo diseño estructural permitió su expresión eficiente en *E. coli* y su purificación para la obtención de una molécula quimérica funcional. La evaluación inmunológica en modelos murinos evidenció que rpZDIII induce respuestas humorales robustas, caracterizadas por la producción de anticuerpos IgG e IgM específicos, el reconocimiento de la proteína E completa y la generación de anticuerpos neutralizantes capaces de bloquear la entrada viral.

Asimismo, la evaluación *in vivo* frente al desafío viral demostró que rpZDIII confiere protección vertical en la descendencia de madres vacunadas, reflejada en una elevada supervivencia neonatal y en la ausencia de carga viral detectable en tejido cerebral, lo que resalta su capacidad para interferir con la transmisión y la patogénesis del ZIKV.

En conjunto, estos hallazgos constituyen evidencia sólida que respalda la continuidad del desarrollo preclínico de este candidato vacunal. De manera general, los resultados obtenidos permiten concluir que rpZDIII representa una alternativa prometedora dentro del panorama actual de estrategias de inmunización contra ZIKV, en un contexto en el que aún no existe una vacuna aprobada.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, C. J., Diaz, C., Nordio, F., Han, H. H., Moss, K. J., Bohning, K., Kumar, P., Liu, M., Patel, H., Pacciarini, F., Mwangi, V., Walter, E., Powell, T. D., El Sahly, H. M., Baldwin, W. R., Santangelo, J., Anderson, E. J., & Dubin, G. (2023). Persistence of Immunogenicity of a Purified Inactivated Zika Virus Vaccine Candidate in Healthy Adults: 2 Years of Follow-up Compared With Natural Infection. *The Journal of infectious diseases*, 227(11), 1303–1312. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac482>
- Alharbi, M., Alshammari, A., Alsabhan, J. F., Alzarea, S. I., Alshammari, T., Alasmari, F., & Alasmari, A. F. (2024). A novel vaccine construct against Zika virus fever: insights from epitope-based vaccine discovery through molecular modeling and immunoinformatics approaches. *Frontiers in immunology*, 15, 1426496. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1426496>
- Allemailem K. S. (2025). In Silico Development of a Chimeric Multi-Epitope Vaccine Targeting *Helicobacter kunzii*: Coupling Subtractive Proteomics and Reverse Vaccinology for Vaccine Target Discovery. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 18(9), 1258. <https://doi.org/10.3390/ph18091258>
- Antonelli, A. C. B., Almeida, V. P., de Castro, F. O. F., Silva, J. M., Pfrimer, I. A. H., Cunha-Neto, E., Maranhão, A. Q., Brígido, M. M., Resende, R. O., Bocca, A. L., & Fonseca, S. G. (2022). In silico construction of a multiepitope Zika virus vaccine using immunoinformatics tools. *Scientific reports*, 12(1), 53. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03990-6>
- Ávila-Pérez, G., Nogales, A., Martín, V., Almazán, F., & Martínez-Sobrido, L. (2018). Reverse Genetic Approaches for the Generation of Recombinant Zika Virus. *Viruses*, 10(11), 597. <https://doi.org/10.3390/v10110597>

- Barjas-Castro, M. L., Angerami, R. N., Cunha, M. S., Suzuki, A., Nogueira, J. S., Rocco, I. M., Maeda, A. Y., Vasami, F. G., Katz, G., Boin, I. F., Stucchi, R. S., Resende, M. R., Esposito, D. L., de Souza, R. P., da Fonseca, B. A., & Addas-Carvalho, M. (2016). Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion*, 56(7), 1684–1688. <https://doi.org/10.1111/trf.13681>
- Basmenj, E. R., Pajhouh, S. R., Ebrahimi Fallah, A., Naijian, R., Rahimi, E., Atighy, H., Ghiabi, S., & Ghiabi, S. (2025). Computational epitope-based vaccine design with bioinformatics approach; a review. *Heliyon*, 11(1), e41714. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e41714>
- Becerra-Solano, L. E., Mateos-Sánchez, L., & López-Muñoz, E. (2021). Microcephaly, an etiopathogenic vision. *Pediatrics and neonatology*, 62(4), 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2021.05.008>
- Beckham, J. D., Pastula, D. M., Massey, A., & Tyler, K. L. (2016). Zika Virus as an Emerging Global Pathogen: Neurological Complications of Zika Virus. *JAMA neurology*, 73(7), 875–879. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.0800>
- Bhagat, R., Kaur, G., & Seth, P. (2021). Molecular mechanisms of zika virus pathogenesis: An update. *The Indian journal of medical research*, 154(3), 433–445. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_169_20
- Bhardwaj, U., Pandey, N., Rastogi, M., & Singh, S. K. (2021). Gist of Zika Virus pathogenesis. *Virology*, 560, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.04.008>
- Braz, J. M., & Batista, M. V. A. (2024). Immunoinformatics-Based Design of Multi-epitope DNA and mRNA Vaccines Against Zika Virus. *Bioinformatics and biology insights*, 18, 11779322241257037. <https://doi.org/10.1177/11779322241257037>

- Buitrago-Pabón, A. L., Ruiz-Sáenz, S., Jiménez-Alberto, A., Aparicio-Ozores, G., Castelán-Vega, J. A., & Ribas-Aparicio, R. M. (2024). An Update on Zika Virus Vaccine Development and New Research Approaches. *Microbiology Research*, 15(2), 667-692. <https://doi.org/10.3390/microbiolres15020044>
- Bujan, L., Mansuy, J. M., Hamdi, S., Pasquier, C., & Joguet, G. (2020). 1 year after acute Zika virus infection in men. *The Lancet Infectious diseases*, 20(1), 25–26. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30678-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30678-4)
- Castanha, P. M. S., & Marques, E. T. A. (2020). A Glimmer of Hope: Recent Updates and Future Challenges in Zika Vaccine Development. *Viruses*, 12(12), 1371. <https://doi.org/10.3390/v12121371>
- Castanha, P. M. S., & Marques, E. T. A. (2020). A Glimmer of Hope: Recent Updates and Future Challenges in Zika Vaccine Development. *Viruses*, 12(12), 1371. <https://doi.org/10.3390/v12121371>
- Crill, W. D., & Roehrig, J. T. (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *Journal of virology*, 75(16), 7769–7773. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7769-7773.2001>
- Dam, S., Tscherne, A., Engels, L., Sutter, G., Osterhaus, A. D. M. E., & Rimmelzwaan, G. F. (2025). Design and evaluation of a poly-epitope based vaccine for the induction of influenza A virus cross-reactive CD8 + T cell responses. *Scientific reports*, 15(1), 10586. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95479-9>
- de Pinho Favaro, M. T., Atienza-Garriga, J., Martínez-Torró, C., Parladé, E., Vázquez, E., Corchero, J. L., Ferrer-Miralles, N., & Villaverde, A. (2022). Recombinant vaccines in 2022: a perspective from the cell factory. *Microbial cell factories*, 21(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01929-8>

- Duca, L. M., Beckham, J. D., Tyler, K. L., & Pastula, D. M. (2017). Zika Virus Disease and Associated Neurologic Complications. *Current infectious disease reports*, 19(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0557-x>
- Dudley, D. M., Aliota, M. T., Mohr, E. L., Weiler, A. M., Lehrer-Brey, G., Weisgrau, K. L., Mohns, M. S., Breitbach, M. E., Rasheed, M. N., Newman, C. M., Gellerup, D. D., Moncla, L. H., Post, J., Schultz-Darken, N., Schotzko, M. L., Hayes, J. M., Eudailey, J. A., Moody, M. A., Permar, S. R., O'Connor, S. L., ... O'Connor, D. H. (2016). A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nature communications*, 7, 12204. <https://doi.org/10.1038/ncomms12204>
- Elliott, K. C., & Mattapallil, J. J. (2024). Zika Virus-A Reemerging Neurotropic Arbovirus Associated with Adverse Pregnancy Outcomes and Neuropathogenesis. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 13(2), 177. <https://doi.org/10.3390/pathogens13020177>
- Elong Ngonu, A., Syed, T., Nguyen, A. V., Regla-Nava, J. A., Susantono, M., Spasova, D., Aguilar, A., West, M., Sparks, J., Gonzalez, A., Branche, E., DeHart, J. L., Vega, J. B., Karmali, P. P., Chivukula, P., Kamrud, K., Aliahmad, P., Wang, N., & Shrestha, S. (2020). CD8⁺ T cells mediate protection against Zika virus induced by an NS3-based vaccine. *Science advances*, 6(45), eabb2154. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb2154>
- Elong Ngonu, A., Vizcarra, E. A., Tang, W. W., Sheets, N., Joo, Y., Kim, K., Gorman, M. J., Diamond, M. S., & Shrestha, S. (2017). Mapping and Role of the CD8⁺ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell host & microbe*, 21(1), 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.010>
- Elong Ngonu, A., Young, M. P., Bunz, M., Xu, Z., Hattakam, S., Vizcarra, E., Regla-Nava, J. A., Tang, W. W., Yamabhai, M., Wen, J., & Shrestha, S. (2019). CD4+

- T cells promote humoral immunity and viral control during Zika virus infection. *PLoS pathogens*, 15(1), e1007474. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007474>
- Essink, B., Chu, L., Seger, W., Barranco, E., Le Cam, N., Bennett, H., Faughnan, V., Pajon, R., Paila, Y. D., Bollman, B., Wang, S., Dooley, J., Kalidindi, S., & Leav, B. (2023). The safety and immunogenicity of two Zika virus mRNA vaccine candidates in healthy flavivirus baseline seropositive and seronegative adults: the results of two randomised, placebo-controlled, dose-ranging, phase 1 clinical trials. *The Lancet Infectious diseases*, 23(5), 621–633. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00764-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00764-2)
- Ezzemani, W., Windisch, M. P., Altawalah, H., Guessous, F., Saile, R., Benjelloun, S., Kettani, A., & Ezzikouri, S. (2023). Design of a multi-epitope Zika virus vaccine candidate - an in-silico study. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 41(9), 3762–3771. <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2055648>
- Fanunza, E., Grandi, N., Quartu, M., Carletti, F., Ermellino, L., Milia, J., Corona, A., Capobianchi, M. R., Ippolito, G., & Tramontano, E. (2021). INMI1 Zika Virus NS4B Antagonizes the Interferon Signaling by Suppressing STAT1 Phosphorylation. *Viruses*, 13(12), 2448. <https://doi.org/10.3390/v13122448>
- Feng Y. (2024). Recent advances in the study of zika virus structure, drug targets, and inhibitors. *Frontiers in pharmacology*, 15, 1418516. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1418516>
- Gaudinski, M. R., Houser, K. V., Morabito, K. M., Hu, Z., Yamshchikov, G., Rothwell, R. S., Berkowitz, N., Mendoza, F., Saunders, J. G., Novik, L., Hendel, C. S., Holman, L. A., Gordon, I. J., Cox, J. H., Edupuganti, S., McArthur, M. A., Roupheal, N. G., Lyke, K. E., Cummings, G. E., Sitar, S., ... VRC 320 study teams (2018). Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA

- vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *Lancet*, 391(10120), 552–562. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33105-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33105-7)
- Giménez-Richarte, Á., Ortiz de Salazar, M. I., Giménez-Richarte, M. P., Collado, M., Fernández, P. L., Clavijo, C., Navarro, L., Arbona, C., Marco, P., & Ramos-Rincon, J. M. (2022). Transfusion-transmitted arboviruses: Update and systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 16(10), e0010843. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010843>
- Han, H. H., Diaz, C., Acosta, C. J., Liu, M., & Borkowski, A. (2021). Safety and immunogenicity of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate in healthy adults: an observer-blind, randomised, phase 1 trial. *The Lancet Infectious diseases*, 21(9), 1282–1292. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30733-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30733-7)
- Huang, X., Wang, X., Zhang, J., Xia, N., & Zhao, Q. (2017). Escherichia coli-derived virus-like particles in vaccine development. *NPJ vaccines*, 2, 3. <https://doi.org/10.1038/s41541-017-0006-8>
- Javed, F., Manzoor, K. N., Ali, M., Haq, I. U., Khan, A. A., Zaib, A., & Manzoor, S. (2018). Zika virus: what we need to know?. *Journal of basic microbiology*, 58(1), 3–16. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700398>
- Kazmi, S. S., Ali, W., Bibi, N., & Nouroz, F. (2020). A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. *Journal of biological research*, 27, 5. <https://doi.org/10.1186/s40709-020-00115-4>
- Khaiboullina, S. F., Ribeiro, F. M., Uppal, T., Martynova, E. V., Rizvanov, A. A., & Verma, S. C. (2019). Zika Virus Transmission Through Blood Tissue Barriers. *Frontiers in microbiology*, 10, 1465. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01465>

- Kim, I. J., Tighe, M. P., Lanthier, P. A., Clark, M. J., De La Barrera, R. A., Dussupt, V., Mendez-Rivera, L., Krebs, S. J., Travis, K. L., Low-Beer, T. C., Cookenham, T. S., Lanzer, K. G., Bernacki, D. T., Szaba, F. M., Schneck, A. A., Ward, J., Thomas, S. J., Modjarrad, K., & Blackman, M. A. (2024). Zika purified inactivated virus (ZPIV) vaccine reduced vertical transmission in pregnant immunocompetent mice. *NPJ vaccines*, 9(1), 32. <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00823-1>
- Kumar, A., Kumar, P., Mishra, P. M., & Giri, R. (2023). Investigating the folding dynamics of NS2B protein of Zika virus. *Virology*, 584, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.04.012>
- Laman, J. D., Huizinga, R., Boons, G. J., & Jacobs, B. C. (2022). Guillain-Barré syndrome: expanding the concept of molecular mimicry. *Trends in immunology*, 43(4), 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.02.003>
- Lee, H. J., Abu Bakar, S., & Shin, O. S. (2025). An updated review of Zika virus vaccine development. *Clinical and experimental vaccine research*, 14(4), 325–334. <https://doi.org/10.7774/cevr.2025.14.e42>
- Lee, Y. S., Cheong, M. S., Lee, J., Bang, E. K., Park, S. I., Park, H. J., Bae, S. H., Yoon, S., Roh, G., Lee, S., Cho, Y., Ha, D., Oh, A., Lee, S. Y., Choi, E. J., Choi, H., Jo, S., Lee, Y., Kim, J., Kwak, H. W., ... Kim, W. (2025). Immunogenicity and protection of a triple repeat domain III mRNA vaccine against Zika virus. *Vaccine*, 43(Pt 2), 126518. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.126518>
- Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S. S., Lee, S. A., Ge, J., Wang, S., Goldman, S. A., Zlokovic, B. V., Zhao, Z., & Jung, J. U. (2016). Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural

- Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell stem cell*, 19(5), 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.019>
- Liu-Helmersson, J., Brännström, Å., Sewe, M. O., Semenza, J. C., & Rocklöv, J. (2019). Estimating Past, Present, and Future Trends in the Global Distribution and Abundance of the Arbovirus Vector *Aedes aegypti* Under Climate Change Scenarios. *Frontiers in public health*, 7, 148. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00148>
- Metzler, A. D., & Tang, H. (2024). Zika Virus Neuropathogenesis-Research and Understanding. *Pathogens*, 13(7), 555. <https://doi.org/10.3390/pathogens13070555>
- Ngono, A. E., & Shresta, S. (2018). Immune Response to Dengue and Zika. *Annual review of immunology*, 36, 279–308. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053142>
- Nürnberg, C., Bodmer, B. S., Fiedler, A. H., Gabriel, G., & Mühlebach, M. D. (2019). A Measles Virus-Based Vaccine Candidate Mediates Protection against Zika Virus in an Allogeneic Mouse Pregnancy Model. *Journal of virology*, 93(3), e01485-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01485-18>
- Pardy, R. D., Rajah, M. M., Condotta, S. A., Taylor, N. G., Sagan, S. M., & Richer, M. J. (2017). Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. *PLoS pathogens*, 13(2), e1006184. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006184>
- Pattnaik, A., Sahoo, B. R., & Pattnaik, A. K. (2020). Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. *Vaccines*, 8(2), 266. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020266>

- Paz, S., & Semenza, J. C. (2016). El Niño and climate change--contributing factors in the dispersal of Zika virus in the Americas?. *Lancet (London, England)*, 387(10020), 745. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00256-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00256-7)
- Peng, Z. Y., Yang, S., Lu, H. Z., Wang, L. M., Li, N., Zhang, H. T., Xing, S. Y., Du, Y. N., & Deng, S. Q. (2024). A review on Zika vaccine development. *Pathogens and disease*, 82, ftad036. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftad036>
- Pielnaa, P., Al-Saadawe, M., Saro, A., Dama, M. F., Zhou, M., Huang, Y., Huang, J., & Xia, Z. (2020). Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*, 543, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>
- Poland, G. A., Kennedy, R. B., Ovsyannikova, I. G., Palacios, R., Ho, P. L., & Kalil, J. (2018). Development of vaccines against Zika virus. *The Lancet. Infectious diseases*, 18(7), e211–e219. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30063-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30063-X)
- Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G., & Kennedy, R. B. (2019). Zika Vaccine Development: Current Status. *Mayo Clinic proceedings*, 94(12), 2572–2586. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.05.016>
- Possas C. (2016). Zika: what we do and do not know based on the experiences of Brazil. *Epidemiology and health*, 38, e2016023. <https://doi.org/10.4178/epih.e2016023>
- Prakash, S., Dhanushkodi, N. R., Zayou, L., Ibraim, I. C., Quadiri, A., Coulon, P. G., Tifrea, D. F., Suzer, B., Shaik, A. M., Chilukuri, A., Edwards, R. A., Singer, M., Vahed, H., Nesburn, A. B., Kuppermann, B. D., Ulmer, J. B., Gil, D., Jones, T. M., & BenMohamed, L. (2024). Cross-protection induced by highly conserved human B, CD4⁺, and CD8⁺T-cell epitopes-based vaccine against severe infection, disease, and death caused by multiple SARS-CoV-2 variants of

concern. *Frontiers in immunology*, 15, 1328905.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1328905>

Prakash, S., Srivastava, R., Coulon, P. G., Dhanushkodi, N. R., Chentoufi, A. A., Tifrea, D. F., Edwards, R. A., Figueroa, C. J., Schubl, S. D., Hsieh, L., Buchmeier, M. J., Bouziane, M., Nesburn, A. B., Kuppermann, B. D., & BenMohamed, L. (2021). Genome-Wide B Cell, CD4⁺, and CD8⁺ T Cell Epitopes That Are Highly Conserved between Human and Animal Coronaviruses, Identified from SARS-CoV-2 as Targets for Preemptive Pan-Coronavirus Vaccines. *Journal of immunology*, 206(11), 2566–2582.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001438>

Prasasty, V. D., Grazzolie, K., Rosmalena, R., Yazid, F., Ivan, F. X., & Sinaga, E. (2019). Peptide-Based Subunit Vaccine Design of T- and B-Cells Multi-Epitopes against Zika Virus Using Immunoinformatics Approaches. *Microorganisms*, 7(8), 226.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7080226>

Rappuoli, R., Black, S., & Bloom, D. E. (2019). Vaccines and global health: In search of a sustainable model for vaccine development and delivery. *Science translational medicine*, 11(497), eaaw2888.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw2888>

Rather, I. A., Lone, J. B., Bajpai, V. K., & Park, Y. H. (2017). Zika Virus Infection during Pregnancy and Congenital Abnormalities. *Frontiers in microbiology*, 8, 581.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00581>

Rather, I. A., Lone, J. B., Bajpai, V. K., & Park, Y. H. (2017). Zika Virus Infection during Pregnancy and Congenital Abnormalities. *Frontiers in microbiology*, 8, 581.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00581>

- Rinas, U., Garcia-Fruitós, E., Corchero, J. L., Vázquez, E., Seras-Franzoso, J., & Villaverde, A. (2017). Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half. *Trends in biochemical sciences*, 42(9), 726–737. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.005>
- Robbiani, D. F., Bozzacco, L., Keeffe, J. R., Khouri, R., Olsen, P. C., Gazumyan, A., Schaefer-Babajew, D., Avila-Rios, S., Nogueira, L., Patel, R., Azzopardi, S. A., Uhl, L. F. K., Saeed, M., Sevilla-Reyes, E. E., Agudelo, M., Yao, K. H., Golijanin, J., Gristick, H. B., Lee, Y. E., Hurley, A., ... Nussenzweig, M. C. (2017). Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. *Cell*, 169(4), 597–609.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.024>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Sá-Guimarães, T. D. E., & Moreira, M. F. (2022). Evidence of Spreading Zika Virus Infection Caused by Males of Different Species. *Viruses*, 14(9), 2047. <https://doi.org/10.3390/v14092047>
- Salisch, N. C., Stephenson, K. E., Williams, K., Cox, F., van der Fits, L., Heerwegh, D., Truysers, C., Habets, M. N., Kanjilal, D. G., Larocca, R. A., Abbink, P., Liu, J., Peter, L., Fierro, C., De La Barrera, R. A., Modjarrad, K., Zahn, R. C., Hendriks, J., Cahill, C. P., Leyssen, M., ... Barouch, D. H. (2021). A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase 1 Study of Ad26.ZIKV.001, an Ad26-Vectored Anti-Zika Virus Vaccine. *Annals of internal medicine*, 174(5), 585–594. <https://doi.org/10.7326/M20-5306>

- Sanchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M., & Reche, P. A. (2017). Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *Journal of immunology research*, 2017, 2680160. <https://doi.org/10.1155/2017/2680160>
- Schoch, C. L., et al. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database, 2020, baaa062. Recuperado de NCBI Taxonomy Browser el 04 diciembre 2024 de <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Secretaría de Salud. (2025). Casos confirmados de infección por virus Zika Recuperado el 04 de diciembre del 2025 de <https://www.gob.mx/salud/documentos/casos-confirmados-de-infeccion-por-virus-zika-2025>
- Semenza, J. C., Rocklöv, J., & Ebi, K. L. (2022). Climate Change and Cascading Risks from Infectious Disease. *Infectious diseases and therapy*, 11(4), 1371–1390. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00647-3>
- Shawan, M. M. A. K., Sharma, A. R., Halder, S. K., Arian, T. A., Shuvo, M. N., Sarker, S. R., & Hasan, M. A. (2023). Advances in Computational and Bioinformatics Tools and Databases for Designing and Developing a Multi-Epitope-Based Peptide Vaccine. *International journal of peptide research and therapeutics*, 29(4), 60. <https://doi.org/10.1007/s10989-023-10535-0>
- Shen, S., Xiao, W., Zhang, L., Lu, J., Funk, A., He, J., Tu, S., Yu, J., Yang, L., Fontanet, A., Bao, W., Cheng, K. K., & Qiu, X. (2021). Prevalence of congenital microcephaly and its risk factors in an area at risk of Zika outbreaks. *BMC pregnancy and childbirth*, 21(1), 214. <https://doi.org/10.1186/s12884-021-03705-9>
- Sintara, P., Suphaprueksapong, P., Jetawattana, S., Wiriyarat, W., Akkhawattanakul, Y., Charngkaew, K., Chomanee, N., Saelee, J., Wongs,

- A., Priengprom, T., & Tassaneetrithep, B. (2025). Safety and immunogenicity of inactivated Zika virus vaccine by gamma irradiation. *Vaccine*, 26, 2590-1362. <https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2025.100706>.
- Slavov, S. N., Otaguiri, K. K., Kashima, S., & Covas, D. T. (2016). Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. *Brazilian journal of medical and biological research*, 49(5), e5420. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165420>
- Staneková, Z., & Varečková, E. (2010). Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development. *Virology journal*, 7, 351. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-351>
- Stephenson, K. E., Tan, C. S., Walsh, S. R., Hale, A., Ansel, J. L., Kanjilal, D. G., Jaegle, K., Peter, L., Borducchi, E. N., Nkolola, J. P., Makoni, T., Fogel, R., Bradshaw, C., Tyler, A., Moseley, E., Chandrashekar, A., Yanosick, K. E., Seaman, M. S., Eckels, K. H., De La Barrera, R. A., ... Barouch, D. H. (2020). Safety and immunogenicity of a Zika purified inactivated virus vaccine given via standard, accelerated, or shortened schedules: a single-centre, double-blind, sequential-group, randomised, placebo-controlled, phase 1 trial. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(9), 1061–1070. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30085-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30085-2)
- Tebas, P., Roberts, C. C., Muthumani, K., Reuschel, E. L., Kudchodkar, S. B., Zaidi, F. I., White, S., Khan, A. S., Racine, T., Choi, H., Boyer, J., Park, Y. K., Trottier, S., Remigio, C., Krieger, D., Spruill, S. E., Bagarazzi, M., Kobinger, G. P., Weiner, D. B., & Maslow, J. N. (2021). Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine. *The New England journal of medicine*, 385(12), e35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708120>

- Teixeira, F. M. E., Oliveira, L. M., Branco, A. C. C. C., Alberca, R. W., de Sousa, E. S. A., Leite, B. H. S., Adan, W. C. D. S., Duarte, A. J. D. S., Lins, R. D., Sato, M. N., & Viana, I. F. T. (2024). Enhanced immunogenicity and protective efficacy in mice following a Zika DNA vaccine designed by modulation of membrane-anchoring regions and its association to adjuvants. *Frontiers in immunology*, 15, 1307546. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1307546>
- Tesla, B., Demakovsky, L. R., Mordecai, E. A., Ryan, S. J., Bonds, M. H., Ngonghala, C. N., Brindley, M. A., & Murdock, C. C. (2018). Temperature drives Zika virus transmission: evidence from empirical and mathematical models. *Proceedings. Biological sciences*, 285(1884), 20180795. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0795>
- Thomas, S. J., & Barrett, A. (2020). Zika vaccine pre-clinical and clinical data review with perspectives on the future development. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(10), 2524–2536. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1730657>
- Toussaint, N. C., Maman, Y., Kohlbacher, O., & Louzoun, Y. (2011). Universal peptide vaccines - optimal peptide vaccine design based on viral sequence conservation. *Vaccine*, 29(47), 8745–8753. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.132>
- Ullah, H., Ullah, S., Li, J., Yang, F., & Tan, L. (2024). An In Silico Design of a Vaccine against All Serotypes of the Dengue Virus Based on Virtual Screening of B-Cell and T-Cell Epitopes. *Biology*, 13(9), 681. <https://doi.org/10.3390/biology13090681>
- Valente, A. P., & Moraes, A. H. (2019). Zika virus proteins at an atomic scale: how does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection?. *The journal of venomous animals and toxins*

including tropical diseases, 25, e20190013. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0013>

Van Leur, S. W., Heunis, T., Munnur, D., & Sanyal, S. (2021). Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence*, 12(1), 2814–2838. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059>

Villalobos-Sánchez, E., Burciaga-Flores, M., Zapata-Cuellar, L., Camacho-Villegas, T. A., & Elizondo-Quiroga, D. E. (2022). Possible Routes for Zika Virus Vertical Transmission in Human Placenta: A Comprehensive Review. *Viral immunology*, 35(6), 392–403. <https://doi.org/10.1089/vim.2021.0199>

ViralZone. (2025). Zika virus. Expasy. Recuperado el 04 de diciembre del 2025 de <https://viralzone.expasy.org/6756>

Wang, Y., Ling, L., Zhang, Z., & Marin-Lopez, A. (2022). Current Advances in Zika Vaccine Development. *Vaccines*, 10(11), 1816. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111816>

WHO guidelines for the prevention of sexual transmission of Zika virus. (2020). World Health Organization.

Wilder-Smith, A., & Osman, S. (2020). Public health emergencies of international concern: a historic overview. *Journal of travel medicine*, 27(8), taaa227. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa227>

Winkler, C. W., Myers, L. M., Woods, T. A., Messer, R. J., Carmody, A. B., McNally, K. L., Scott, D. P., Hasenkrug, K. J., Best, S. M., & Peterson, K. E. (2017). Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. *Journal of immunology*, 198(9), 3526–3535. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601949>

- Winkler, C. W., Woods, T. A., Rosenke, R., Scott, D. P., Best, S. M., & Peterson, K. E. (2017). Sexual and Vertical Transmission of Zika Virus in anti-interferon receptor-treated Rag1-deficient mice. *Scientific reports*, 7(1), 7176. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07099-7>
- Woodson, S. E., & Morabito, K. M. (2024). Continuing development of vaccines and monoclonal antibodies against Zika virus. *NPJ vaccines*, 9(1), 91. <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00889-x>
- Yuan, L., Li, X., Li, M., Bi, R., Li, Y., Song, J., Li, W., Yan, M., Luo, H., Sun, C., & Shu, Y. (2024). In silico design of a broad-spectrum multiepitope vaccine against influenza virus. *International journal of biological macromolecules*, 254(Pt 3), 128071. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128071>
- Zhang, X., Xie, X., Xia, H., Zou, J., Huang, L., Popov, V. L., Chen, X., & Shi, P. Y. (2019). Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly. *mBio*, 10(5), e02375-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02375-19>
- Zhang, X., Zhang, Y., Jia, R., Wang, M., Yin, Z., & Cheng, A. (2021). Structure and function of capsid protein in flavivirus infection and its applications in the development of vaccines and therapeutics. *Veterinary research*, 52(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00966-2>
- Zhou, P., Zhang, Q., Yang, Y., Wu, W., Chen, D., Zheng, Z., Jongkaewwattana, A., Jin, H., Zhou, H., & Luo, R. (2024). Cleavage of SQSTM1/p62 by the Zika virus protease NS2B3 prevents autophagic degradation of viral NS3 and NS5 proteins. *Autophagy*, 20(12), 2769–2784. <https://doi.org/10.1080/15548627.2024.2390810>

ARTÍCULO 1

- Akbari, E., Seyedinkhorasani, M., & Bolhassani, A. (2023). Conserved multiepitope vaccine constructs: A potent HIV-1 therapeutic vaccine in clinical trials. *The Brazilian journal of infectious diseases*, 27 (3), 102774. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.102774>
- Antonelli, A. C. B., Almeida, V. P., De Castro, F. O. F., Silva, J. M., Pfrimer, I. A. H., Cunha-Neto, Maranhao, A Q., Brígido, M.M., Resende, r. O., Bocca, A. L., & Fonseca, S. G. (2022). In silico construction of a multiepitope Zika virus vaccine using immunoinformatics tools. *Scientific Reports*, 12 (1), 53. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03990-6>
- Argos, P. (1990). An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion. *Journal of molecular biology*, 211 (4), 943–958. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90085-Z](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90085-Z)
- Balint, E., Somani, A. A., Giles, E. C., Feng, E., Vahedi, F., & Ashkar, A. A. (2022). Vaginal transmission causes prolonged Zika virus shedding in the vaginal mucosa and delays systemic dissemination. *Immunology and cell biology*, 100 (6), 468–473. <https://doi.org/10.1111/imcb.12549>
- Baud, D., Gubler, D. J., Schaub, B., Lanteri, M. C., & Musso, D. (2017). An update on Zika virus infection. *Lancet*, 390 (10107), 2099–2109. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31450-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31450-2)
- Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X. Z., & Zhou, T. (2021). Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 630551. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>

- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G. S., & Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242 (4877), 423–426. <https://doi.org/10.1126/science.3140379>
- Carrillo-Hernández, M. Y., Ruiz-Saenz, J., Villamizar, L. J., Gómez-Rangel, S. Y., & Martínez-Gutierrez, M. (2018). Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. *BMC infectious diseases*, 18 (1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-2976-1>
- Castanha, P. M. S., & Marques, E. T. A. (2020). Vaccine development during global epidemics: The Zika experience. *The Lancet. Infectious diseases*, 20 (9), 998–999. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30360-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30360-1)
- Cavallaro, A. S., Mahony, D., Commins, M., Mahony, T. J., & Mitter, N. (2011). Endotoxin-free purification for the isolation of bovine viral diarrhoea virus E2 protein from insoluble inclusion body aggregates. *Microbial cell factories*, 10, 57. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-57>
- Chen, C. H., Chen, C. C., Wang, W. B., Lionel, V., Liu, C. C., Huang, L. M., & Wu, S.C. (2022). Intranasal immunization with Zika virus envelope domain III–flagellin fusion protein elicits systemic and mucosal immune responses and protection against subcutaneous and intravaginal virus challenges. *Pharmaceutics*, 14 (5), 1014. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051014>
- Cibulski, S., Varela, A. P. M., Teixeira, T. F., Cancela, M. P., Sesterheim, P., Souza, D. O., Roehe, P. M., & Silveira, F. (2021). Zika virus envelope domain III recombinant protein delivered with saponin-based nanoadjuvant from *Quillaja brasiliensis* enhances anti-Zika immune responses, including neutralizing

- antibodies and splenocyte proliferation. *Frontiers in immunology*, 12, 632714. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.632714>
- Coffey, L. L., Vasilakis, N., Brault, A. C., Powers, A. M., Tripet, F., & Weaver, S. C. (2008). Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (19), 6970–6975. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712130105>
- Cui, G., Si, L., Wang, Y., Zhou, J., Yan, H., & Jiang, L. (2021). Antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue virus: Identification of the key amino acid that is vital in DENV vaccine research. *The Journal of gene medicine*, 23 (2), e3297. <https://doi.org/10.1002/jgm.3297>
- Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., Sakuntabhai, A., Cao-Lormeau, V. M., Malasit, P., Rey, F. A., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. R. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nature immunology*, 17 (9), 1102–1108. <https://doi.org/10.1038/ni.3515>
- Dick, G. W., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46 (5), 509–520. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- EMBL–EBI. (2022). *AlphaFold protein structure database*. <https://alphafold.ebi.ac.uk>
- Han, J. F., Qiu, Y., Yu, J. Y., Wang, H. J., Deng, Y. Q., Li, X. F., Hui, Z., Han, X.S., & Cheng, F.Q. (2017). Immunization with truncated envelope protein of Zika virus induces protective immune response in mice. *Scientific Reports*, 7, 10047. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10595-5>

- Javed, F., Manzoor, K. N., Ali, M., Haq, I. U., Khan, A. A., Zaib, A., & Manzoor, S. (2018). Zika virus: What we need to know?. *Journal of basic microbiology*, 58 (1), 3–16. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700398>
- Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Current status and future perspectives. *Open biology*, 6 (8), 160196. <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>
- Kardani, K., Hashemi, A., & Bolhassani, A. (2020). Comparative analysis of two HIV-1 multiepitope polypeptides for stimulation of immune responses in BALB/c mice. *Molecular immunology*, 119, 106–122. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.01.013>
- Kaushik, H., Deshmukh, S. K., Solanki, A. K., Bhatia, B., Tiwari, A., & Garg, L. C. (2019). Immunization with recombinant fusion of LTB and linear epitope (40–62) of epsilon toxin elicits protective immune response against the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D. *AMB Express*, 9 (1), 105. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0824-3>
- Krauer, F., Riesen, M., Reveiz, L., Oladapo, O. T., Martínez-Vega, R., Porgo, T. V., Haefliger, A., Broutet, N. J., & Low, N. (2017). Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain-Barré syndrome: Systematic review. *PLOS Medicine*, 14 (1), e1002203. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002203>
- Kumar, P. R., Ojha, R., Mishra, A., & Kumar, P. V. (2018). Designing B- and T-cell multi-epitope-based subunit vaccine using immunoinformatics approach to control Zika virus infection. *Journal of cellular biochemistry*, 119 (9), 7631–7642. <https://doi.org/10.1002/jcb.27110>

- Lazear, H. M., & Diamond, M. S. (2016). Zika virus: New clinical syndromes and its emergence in the Western Hemisphere. *Journal of virology*, 90 (10), 4864–4875. <https://doi.org/10.1128/JVI.00252-16>
- Liang, H., Yang, R., Liu, Z., Li, M., Liu, H., & Jin, X. (2018). Recombinant Zika virus envelope protein elicited protective immunity against Zika virus in immunocompetent mice. *PloS one*, 13 (3), e0194860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194860>
- Lozier, M. J., Burke, R. M., Lopez, J., Acevedo, V., Amador, M., Read, J. S., Jara, A., Waterman, S. H., Barrera, R., Muñoz-Jordaan, J., Rivera-Garcia, B., & Sharp, T. M. (2018). Differences in prevalence of symptomatic Zika virus infection, by age and sex—Puerto Rico, 2016. *The Journal of infectious diseases*, 217 (11), 1678–1689. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix630>
- Morais, L. M., Chaves, T. S., Medeiros, M. A., Pereira, K. A. B., Jurgilas, P. B., Barbosa de Lima, S. M., Missailidis, S., & Bispo de Filippis, A. M. (2022). Selection and characterization of single-stranded DNA aptamers of diagnostic potential against the whole Zika virus. *Viruses*, 14 (9), 1867. <https://doi.org/10.3390/v14091867>
- Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Clin Microbiol Rev*, 29 (3), 487–524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>
- Pattnaik, A., Sahoo, B. R., & Pattnaik, A. K. (2020). Current status of Zika virus vaccines: Successes and challenges. *Vaccines*, 8 (2), 266. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020266>
- Pielnaa, P., Al-Saadawe, M., Saro, A., Dama, M. F., Zhou, M., Huang, Y., Huang, J., & Xia, Z. (2020). Zika virus—spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*, 543, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>

- Poland, G. A., Kennedy, R. B., Ovsyannikova, I. G., Palacios, R., Ho, P. L., & Kalil, J. (2018). Development of vaccines against Zika virus. *The Lancet. Infectious diseases*, 18 (7), e211–e219. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30063-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30063-X)
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A., & Petersen, L. R. (2016). Zika virus and birth defects—Reviewing the evidence for causality. *The New England journal of medicine*, 374 (20), 1981–1987. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1604338>
- Rong, H., Qi, M., Pan, J., Sun, Y., Gao, J., Zhang, X., Li, W., zhang, B., Zhang, X. E., & Cui, Z. (2022). Self-assembling nanovaccine confers complete protection against Zika virus without causing antibody-dependent enhancement. *Frontiers in immunology*, 13, 905431. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.905431>
- Rubio-Hernández, E. I., Comas-Garcia, M., Coronado-Ipiña, M. A., Colunga-Saucedo, M., González-Sánchez, H. M., & Castillo, C. G. (2023). Astrocytes derived from neural progenitor cells are susceptible to Zika virus infection. *PloS one*, 18 (3), e0283429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283429>
- Shahid, F., Ashfaq, U. A., Javaid, A., & Khalid, H. (2020). Immunoinformatics guided rational design of a next generation multi-epitope-based peptide vaccine by exploring Zika virus proteome. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 80, 104199. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104199>
- Sharma, A., & Lal, S. K. (2017). Zika virus: Transmission, detection, control, and prevention. *Frontiers in microbiology*, 8, 110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00110>
- Shin, M., Kim, K., Lee, H. J., Jung, Y. J., Park, J., & Hahn, T. W. (2022). Vaccination with a Zika virus envelope domain III protein induces neutralizing antibodies

and partial protection against Asian genotype in immunocompetent mice. *Tropical medicine and health*, 50 (1), 91. <https://doi.org/10.1186/s41182-022-00485-6>

Slon, C. J. L., Poggianella, M., Marchese, S., Mossenta, M., Rana, J., Arnoldi, F., Bestagno, M., & Burrone, O. R. (2017). DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. *PloS one*, 12 (7), e0181734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181734>

Solis-Andrade, K. I., Gonzalez-Ortega, O., Govea-Alonso, D. O., Comas-Garcia, M., & Rosales-Mendoza, S. (2022). Production and purification of LTB-RBD: A potential antigen for mucosal vaccine development against SARS-CoV-2. *Vaccines*, 10 (10), 1759. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101759>

Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D. A., Graham, V., Cassotta, A., Bianchi, S., Vanzetta, F., Minola, A., Jaconi, S., Mele, F., Foglierini, M., Pedotti, M., Simonelli, L., Dowall, S., Atkinson, B., Percivalle, E., Simmons, C. P., Varani, L., Blum, J., Baldanti, F., ... Corti, D. (2016). Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*, 353 (6301), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8505>

Swiss Institute of Bioinformatics. (2022). *Expasy ProtParam tool*. <https://www.expasy.org/resources/protparam>

Tahir, U. I., Qamar, M., Rehman, A., Tusleem, K., Ashfaq, U. A., Qasim, M., Zhu, X., Fatima, I., Shahid, F., & Chen, L. L. (2020). Designing of a next generation multi-epitope-based vaccine (MEV) against SARS-CoV-2: Immunoinformatics and in silico approaches. *PloS one*, 15 (12), e0244176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244176>

- Tsetsarkin, K. A., Kenney, H., Chen, R., Liu, G., Manukyan, H., Whitehead, S. S., Laassri, M., chumakov, K., & Pletnev, A. G. (2016). A full-length infectious cDNA clone of Zika virus from the 2015 epidemic in Brazil as a genetic platform for studies of virus–host interactions and vaccine development. *mBio*, 7 (4), e01114-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01114-16>
- Vannice, K. S., Cassetti, M. C., Eisinger, R. W., Hombach, J., Knezevic, I., Marston, H. D., Wilder-Smith, A., Cavaleri, M., & Krause, P. R. (2019). Demonstrating vaccine effectiveness during a waning epidemic: A WHO/NIH meeting report on approaches to development and licensure of Zika vaccine candidates. *Vaccine*, 37 (6), 863–868. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.040>
- Vatti, A., Monsalve, D. M., Pacheco, Y., Chang, C., Anaya, J. M., & Gershwin, M. E. (2017). Original antigenic sin: A comprehensive review. *Journal of autoimmunity*, 83, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.04.008>
- Wang, Z., Li, H., Guan, W., Ling, H., Wang, Z., Mu, T., Shuler, F. D., & Fang, X. (2010). Human SUMO fusion systems enhance protein expression and solubility. *Protein expression and purification*, 73 (2), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.05.001>
- World Health Organization. (2022). Zika epidemiology update. <https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update---february-2022>
- World Health Organization. (2023). Zika virus disease: Outbreak 2015–2016. <https://www.who.int/emergencies/situations/zika-virus-outbreak>
- Yang, M., Dent, M., Lai, H., Sun, H., & Chen, Q. (2017). Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune

responses against Zika virus. *Vaccine*, 35 (33), 4287–4294. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.052>

Yang, M., Lai, H., Sun, H., & Chen, Q. (2017). Virus-like particles that display Zika virus envelope protein domain III induce potent neutralizing immune responses in mice. *Scientific Reports*, 7, 7679. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08247-9>

ARTÍCULO 2

- Balint, E., Montemarano, A., Feng, E., & Ashkar, A. A. (2021). From Mosquito Bites to Sexual Transmission: Evaluating Mouse Models of Zika Virus Infection. *Viruses*, 13(11), 2244. <https://doi.org/10.3390/v13112244>
- Caine, E. A., Jagger, B. W., & Diamond, M. S. (2018). Animal models of Zika virus infection during pregnancy. *Viruses*, 10(11), 598. <https://doi.org/10.3390/v10110598>
- Carrera, J., Trenerry, A. M., Simmons, C. P., & Mackenzie, J. M. (2021). Flavivirus replication kinetics in early-term placental cell lines with different differentiation pathways. *Virology journal*, 18(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01720-y>
- Cibulski, S., Varela, A. P. M., Teixeira, T. F., Cancela, M. P., Sesterheim, P., Souza, D. O., Roehe, P.M., & Silveira, F. (2021). Zika Virus Envelope Domain III Recombinant Protein Delivered With Saponin-Based Nanoadjuvant From *Quillaja brasiliensis* Enhances Anti-Zika Immune Responses, Including Neutralizing Antibodies and Splenocyte Proliferation. *Frontiers in immunology*, 12, 632714. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.632714>
- Clancy, C. S., Van Wettere, A. J., Siddharthan, V., Morrey, J. D., & Julander, J. G. (2018). Comparative Histopathologic Lesions of the Male Reproductive Tract during Acute Infection of Zika Virus in AG129 and *Ifnar*^{-/-} Mice. *The American journal of pathology*, 188(4), 904–915. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.12.019>

- Da Costa, H. H. M., Bielavsky, M., Orts, D. J. B., Araujo, S., Adriani, P. P., Nogueira, J. S., Astray, R. M., Pandey, R. P., Lancellotti, M., Cunha-Junior, J. P., & Prudencio, C. R. (2023). Production of Recombinant Zika Virus Envelope Protein by Airlift Bioreactor as a New Subunit Vaccine Platform. *International journal of molecular sciences*, 24(18), 13955. <https://doi.org/10.3390/ijms241813955>
- Duggal, N. K., McDonald, E. M., Ritter, J. M., & Brault, A. C. (2018). Sexual transmission of Zika virus enhances in utero transmission in a mouse model. *Scientific reports*, 8(1), 4510. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22840-6>
- Eder, J., Zijlstra-Willems, E., Koen, G., Kootstra, N. A., Wolthers, K. C., & Geijtenbeek, T. B. (2023). Transmission of Zika virus by dendritic cell subsets in skin and vaginal mucosa. *Frontiers in immunology*, 14, 1125565. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1125565>
- Emanuel, J., Callison, J., & Dowd, K. A. (2018). A VSV-based Zika virus vaccine protects mice from lethal challenge. *Scientific reports*, 8, 11043. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29401-x>
- Giraldo, M. I., Gonzalez-Orozco, M., & Rajsbaum, R. (2023). Pathogenesis of Zika Virus Infection. *Annual review of pathology*, 18, 181–203. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031521-034739>
- Huang, Z., Zhang, Y., Li, H., Zhu, J., Song, W., Chen, K., Zhang, Y., & Lou, Y. (2023). Vaccine development for mosquito-borne viral diseases. *Frontiers in immunology*, 14, 1161149. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1161149>

- Johnson, K. E. E., Noval, M. G., Rangel, M. V., De Jesus, E., Geber, A., Schuster, S., Cadwell, K., Ghedin, E., & Stapleford, K. A. (2020). Mapping the evolutionary landscape of Zika virus infection in immunocompromised mice. *Virus evolution*, 6(2), veaa092. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa092>
- Jurado, K. A., Yockey, L. J., Wong, P. W., Lee, S., Huttner, A. J., & Iwasaki, A. (2018). Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice. *Nature microbiology*, 3(2), 141–147. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0060-z>
- Komarasamy, T. V., Adnan, N. A. A., James, W., & Balasubramaniam, V. R. M. T. (2022). Zika Virus Neuropathogenesis: The Different Brain Cells, Host Factors and Mechanisms Involved. *Frontiers in immunology*, 13, 773191. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.773191>
- Lazear, H. M., Govero, J., Smith, A. M., Platt, D. J., Fernandez, E., Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2016). A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell host & microbe*, 19(5), 720–730. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.010>
- Lee, Y. S., Cheong, M. S., Lee, J., Bang, E. K., Park, S. I., Park, H. J., Bae, S. H., Yoon, S., Roh, G., Lee, S., Cho, Y., Ha, D., Oh, A., Lee, S. Y., Choi, E. J., Choi, H., Jo, S., Lee, Y., Kim, J., Kwak, H. W., ... Kim, W. (2025). Immunogenicity and protection of a triple repeat domain III mRNA vaccine against Zika virus. *Vaccine*, 43, 126518. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.126518>
- Lefèvre, C., Cook, G. M., Dinan, A. M., Torii, S., Stewart, H., Gibbons, G., Nicholson, A. S., Echavarría-Consuegra, L., Meredith, L. W., Lulla, V., McGovern, N., Kenyon, J. c., Goofellow, I., Deane, J. E., Graham, S. C., Lakatosa, A., Lamberechts, L., Brierley, I., & Irigoyen, N. (2024). Zika viruses encode 5' upstream open reading frames affecting infection of human brain cells. *Nature communications*, 15(1), 8822. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53085-9>

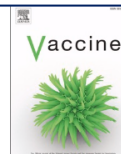
- Metzler, A. D., & Tang, H. (2024). Zika Virus Neuropathogenesis—Research and Understanding. *Pathogens*, 13(7), 555. <https://doi.org/10.3390/pathogens13070555>
- Miranda-López, A., González-Ortega, O., Govea-Alonso, D. O., Betancourt-Mendiola, L., Comas-García, M., & Rosales-Mendoza, S. (2024). Rational design and production of a chimeric antigen targeting Zika virus that induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, 42(17), 3674–3683. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.04.080>
- Monel, B., Compton, A. A., Bruel, T., Amraoui, S., Burlaud-Gaillard, J., Roy, N., Guivel-Benhassine, F., Porrot, F., Génin, P., Meertens, L., Sinigaglia, L., Jouvenet, N., Weil, R., Casartelli, N., Demangel, C., Simon-Lorieré, E., Moris, A., Roingeard, P., Amara, A., & Schwartz, O. (2017). Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *The EMBO journal*, 36(12), 1653–1668. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695597>
- Nazerai, L., Schøller, A. S., Rasmussen, P. O. S., Buus, S., Stryhn, A., Christensen, J. P., & Thjomsen, A. R. (2018). A New In Vivo Model to Study Protective Immunity to Zika Virus Infection in Mice With Intact Type I Interferon Signaling. *Frontiers in immunology*, 9, 593. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00593>
- Pena, L. J., Miranda Guarines, K., Duarte Silva, A. J., Sales Leal, L. R., Mendes Félix, D., Silva, A., de Oliveira, S. A., Junqueira Ayres, C. F., Júnior, A. S., & de Freitas, A. C. (2018). In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. *The Journal of general virology*, 99(12), 1529–1550. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001153>

- Peng, Z. Y., Yang, S., Lu, H. Z., Wang, L. M., Li, N., Zhang, H. T., Xing, S. Y., du, Y. N., & Deng, S. Q. (2024). A review on Zika vaccine development. *Pathogens and disease*, 82, ftad036. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftad036>
- Rossignol, E. D., Peters, K. N., Connor, J. H., & Bullitt, E. (2017). Zika virus induced cellular remodeling. *Cellular microbiology*, 19(8), e12740. <https://doi.org/10.1111/cmi.12740>
- Ruiz, S. I., Zumbrun, E. E., & Nalca, A. (2017). Animal models of human viral diseases. *Animal Models for the Study of Human Disease* (pp. 853–901). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6.00033-4>
- Santos, G. P. G., Gouveia, M. T. O., Costa, R. M. P. G., Santos, A. M. R. D., & Avelino, F. V. S. D. (2020). Effects in the development of children exposed to Zika virus in the fetal period: An integrative review. *Revista Brasileira de Enfermagem*, 73, e20190883. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2019-0883>
- Sapparapu, G., Fernandez, E., Kose, N., Cao, B., Fox, J. M., Bombardi, R. G., Zhao, H., Nelson, C. A., Bryan, A. L., Barnes, T., Davidson, E., Mysorekar, I. U., Fremont, D. H., Doranz, B. J., Diamond, M. S., & Crowe, J. E. (2016). Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature*, 540(7633), 443–447. <https://doi.org/10.1038/nature20564>
- Shin, M., Kang, H., Shin, K. R., Lee, R., Kim, K., Min, K., Cho, K. N., Sohn, E. J., Kim, K. S., Kim, S. H., Cho, Y. J., Park, J., & Hahn, T. W. (2023). Plant-expressed Zika virus envelope protein elicited protective immunity against the Zika virus in immunocompetent mice. *Scientific Reports*, 13(1), 22955. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47428-7>

- Smith, D. R., Sprague, T. R., Hollidge, B. S., Valdez, S. M., Padilla, S. L., Bellanca, S. A., Golden, J. W., Coyne, S. R., Kulesh, D. A., Miller, L. J., Haddow, A. D., Koeheler, J. W., Gromowski, G. D., Jarman, R. G., ... Nasar, F. (2018). African and Asian Zika Virus Isolates Display Phenotypic Differences Both In Vitro and In Vivo. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(2), 432–444. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0685>
- Steffen, T., Hassert, M., Hoft, S. G., Stone, E. T., Zhang, J., Geerling, E., Grimberg, B. T., Roberts, M. S., Pinto, A. K., & Brien, J. D. (2020). Immunogenicity and Efficacy of a Recombinant Human Adenovirus Type 5 Vaccine against Zika Virus. *Vaccines*, 8(2), 170. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020170>
- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S. C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., Yao, B., sin, J., Zhang, F., Lee, E. M., Christian, K. M., Didier, R. A., Jin, P., Song, H., & Ming, G. L. (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*, 18(5), 587–590. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>
- Tang, W. W., Young, M. P., Mamidi, A., Regla-Nava, J. A., Kim, K., & Shresta, S. (2016). A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral Replication. *Cell reports*, 17, 3091–3098. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.070>
- Tajik, S., Farahani, A. V., Ardekani, O. S., Seyedi, S., Tayebi, Z., Kami, M., Aghaei, F., Hosseini, T. M., Nia, M. M. K., soheili, R., & Letafati, A. (2024). Zika virus tropism and pathogenesis: understanding clinical impacts and transmission dynamics. *Virology journal*, 21(1), 271. <https://doi.org/10.1186/s12985-024-02547-z>

- Tsetsarkin, K. A., Kenney, H., Chen, R., Liu, G., Manukyan, H., Whitehead, S. S., Laasari, M., Chumakov, K., & Pletnev, A. G. (2016). A Full-Length Infectious cDNA Clone of Zika Virus from the 2015 Epidemic in Brazil as a Genetic Platform for Studies of Virus–Host Interactions and Vaccine Development. *mBio*, 7(4), e01114–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01114-16>
- Valdes, I., Gil, L., Lazo, L., Cobas, K., Romero, Y., Bruno, A., Suzarte, E., Pérez, Y., Cabrales, A., Ramos, Y., Hermida, L., & Guillén, G. (2023). Recombinant protein based on domain III and capsid regions of Zika virus induces humoral and cellular immune response in immunocompetent BALB/c mice. *Vaccine*, 41(40), 5892–5900. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.08.035>
- Wu, Z., He, Y., Wang, T., Wang, M., Cheng, A., & Chen, S. (2024). DENV and ZIKV infection: Species specificity and broad cell tropism. *Virology*, 600, 110276. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110276>
- Xie, X., Kum, D. B., Xia, H., Luo, H., Shan, C., Zou, J., Muruato, A. E., Medeiros, D. B. A., Nunes, B. T. D., Dallmeier, K., Rossi, S. L., Weaver, S. C., Neyts, J., Wang, T., Vasconcelos, P. F. C., & Shi, P. Y. (2018). A Single-Dose Live-Attenuated Zika Virus Vaccine with Controlled Infection Rounds that Protects against Vertical Transmission. *Cell host & microbe*, 24(4), 487–499.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.09.008>
- Yang, W., Zhang, C., Wu, Y. H., Liu, L. B., Zhen, Z. D., Fan, D. Y., Song, Z. R., Chang, J. T., Wang, P. G., & An, J. (2023). Mice 3D testicular organoid system as a novel tool to study Zika virus pathogenesis. *Virologica Sinica*, 38(1), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.10.001>

- Ye, X., Liu, X., Shu, T., Deng, W., Liao, M., Zheng, Y., Zheng, X., Zhang, X., Li, T., Fan, W., Qu, L., Chen, L., Li, F., & Feng, L. (2021). A Live-Attenuated Zika Virus Vaccine with High Production Capacity Confers Effective Protection in Neonatal Mice. *Journal of virology*, 95(14), e00383–21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00383-21>
- Yu, J., Liu, X., Ke, C., Wu, Q., Lu, W., Qin, Z., He, X., Liu, Y., Deng, J., Xu, S., Li, Y., Zhu, L., Wan, C., Zhang, Q., Xiao, W., Xie, Q., Zhang, B., & Zhao, W. (2017). Effective Suckling C57BL/6, Kunming, and BALB/c Mouse Models with Remarkable Neurological Manifestation for Zika Virus Infection. *Viruses*, 9(7), 165. <https://doi.org/10.3390/v9070165>



Rational design and production of a chimeric antigen targeting Zika virus that induces neutralizing antibodies in mice

Arleth Miranda-López^a, Omar González-Ortega^{a,b}, Dania O. Govea-Alonso^b,
 Lourdes Betancourt-Mendiola^{a,b}, Mauricio Comas-García^{c,d,*}, Sergio Rosales-Mendoza^{a,b,*}

^a Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, SLP 78210, México

^b Sección de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2^a. Sección, San Luis Potosí 78210 México

^c Sección de Microscopía de Alta Resolución, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2^a. Sección, San Luis Potosí 78210, México

^d Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Parque Chapultepec 1570, San Luis, S.L.P., San Luis Potosí 78210, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Zika fever disease
 Multi-epitope vaccine
 Chimeric antigen
 Humoral response
 Neutralizing antibodies

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is considered a public health problem worldwide due to its association with the development of microcephaly and the Guillain-Barré syndrome. Currently, there is no specific treatment or vaccine approved to combat this disease, and thus, developing safe and effective vaccines is a relevant goal. In this study, a multi-epitope protein called rpZDIII was designed based on a series of ZIKV antigenic sequences, a bacterial carrier, and linkers. The analysis of the predicted 3D structure of the rpZDIII chimeric antigen was performed on the AlphaFold 2 server, and it was produced in *E. coli* and purified from inclusion bodies, followed by solubilization and refolding processes. The yield achieved for rpZDIII was 11 mg/L in terms of pure soluble recombinant protein per liter of fermentation. rpZDIII was deemed immunogenic since it induced serum IgG and IgM responses in mice upon subcutaneous immunization in a three-dose scheme. Moreover, sera from mice immunized with rpZDIII showed neutralizing activity against ZIKV. Therefore, this study reveals rpZDIII as a promising immunogen for the development of a rationally designed multi-epitope vaccine against ZIKV, and completion of its preclinical evaluation is guaranteed.

1. Introduction

The Zika virus (ZIKV) belongs to the *Flaviviridae* family and is the causal agent of Zika Fever or Zika virus disease [1]. The ZIKV was first isolated in 1947 from a Macaque in the Zika Forest of Uganda and remained confined to the African continent for most of the 20th century [2]. In 2016, the World Health Organization declared the Brazil Zika fever epidemic a Public Health Emergency of International concern [3]. According to the latest epidemiological update (February 2022), infections caused by this virus have been documented in 89 countries and territories distributed in five of the six WHO regions: Africa, Europe, Southeast Asia, Western Pacific, and the Americas [4,5]. Despite the epidemiological data, the detection and notification of confirmed cases is limited; approximately 80 % of infections are asymptomatic, and 20 % have mild manifestations [5].

The main transmission of ZIKV, like for most flaviviruses, is through arthropods vectors of the genus *Aedes*. Nonetheless, this virus poses a unique threat to human health as it can be transmitted through blood transfusions, infected bodily fluids (e.g., urine and tears), sexual contact, and vertically from the mother to the fetus [6,7]. The symptoms of the Zika virus disease last 2–7 days, and the incubation period ranges from 3–12 days [8]. The most common symptoms of the Zika virus disease are fever, red eyes, joint pain, headache, and maculopapular rash [9]. Moreover, the Asian strain can cause a series of congenital abnormalities [10], such as microcephaly [11] and the Guillain-Barré syndrome [12].

ZIKV is an enveloped icosahedral virus with positive single-stranded RNA of approximately 11 kb. The virion has a diameter of 50–60 nm and contains the 240 copies of the C, prM, and E proteins, and one copy of the genomic RNA. Its genome encodes for a polyprotein that gives rise to three structural proteins (proteins C, prM, and E) and seven non-

* Corresponding authors at: Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2^a. Sección, San Luis Potosí 78210, México.

E-mail addresses: mauricio.comas@uaslp.mx (M. Comas-García), rosales.s@uaslp.mx (S. Rosales-Mendoza).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.04.080>

Received 14 December 2023; Received in revised form 14 March 2024; Accepted 25 April 2024

0264-410X/© 2024 Elsevier India Pvt Ltd. All rights reserved.



The rpZDIII vaccine triggers vertical protection on newborn mice against zika virus infection

Arleth Miranda-López^{a,c}, Claudia G Castillo^b, Omar González-Ortega^{a,c},
 Andrea Romero-Maldonado^c, Mauricio Comas-García^{d,e,*,**},
 Sergio Rosales-Mendoza^{a,c,f,*}

^a Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, SLP, 78210, Mexico

^b Laboratorio de Células Neuronales Troncales Humanas, Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2^a. Sección, San Luis Potosí 78210, Mexico

^c Sección de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2^a. Sección, San Luis Potosí 78210, Mexico

^d Sección de Microscopía de Alta Resolución, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2^a. Sección, San Luis Potosí 78210, Mexico

^e Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Parque Chapultepec 1570, 78210 San Luis, S.L.P., San Luis Potosí 78210, Mexico

^f Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:

Humoral response
 Viral challenge
 Protective vertical immunity
 Chimeric antigen
 Immunocompetent mice

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) infection is a significant public health concern, associated with serious complications such as Guillain-Barré syndrome and microcephaly. Although several ZIKV vaccine candidates are in various stages of development, none have yet been approved for human use. Previously, the rpZDIII ZIKV vaccine candidate was developed and shown to elicit ZIKV-neutralizing antibodies in BALB/c mice. In this study, the protective effects of rpZDIII were evaluated in newborn C57BL/6 mice born to mothers vaccinated with a three-dose regimen. The vaccine induced maternal IgG responses that recognized the full-length E protein. Upon viral challenge, 80 % of the vaccinated newborns survived, displaying progressive weight gain and normal clinical appearance throughout the observation period. In contrast, offspring from unvaccinated mothers succumbed to infection. Furthermore, viral RNA was undetectable in the brain tissue of newborns from vaccinated mothers, whereas high viral loads were observed in unvaccinated mothers. These findings demonstrate the *in vivo* protective efficacy of the rpZDIII vaccine and support its continued preclinical development as a promising ZIKV vaccine candidate.

1. Introduction

In recent years, Zika virus (ZIKV) has emerged as a public health concern worldwide. According to the World Health Organization (WHO), cases have been reported in approximately 100 territories and countries [1]. ZIKV has a positive-sense single-stranded RNA genome encoding a polyprotein, which is divided into three structural proteins: capsid (C), precursor/membrane (pr/M), and envelope (E); and seven nonstructural proteins: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 [2,3].

ZIKV infection is primarily associated with the development of Guillain-Barré syndrome in adults and microcephaly in newborns [4,5].

ZIKV has a wide tropism, infecting skin cells (e.g., dermal fibroblasts, epidermal keratinocytes, dendritic cells, and Langerhans cells), neuronal cells (e.g., embryonic cortical neural progenitor cells (hNPCs), mature neurons, radial glial cells, and astrocytes), and reproductive tract cells (e.g., Sertoli cells, Leydig cells, vaginal epithelial cells, uterine fibroblasts, and placental cells such as Hofbauer cells, trophoblasts, and endothelial cells) [6–9].

Pregnant women are particularly vulnerable to ZIKV infection, especially during the first trimester of gestation [10], which can lead to complications such as intrauterine growth retardation, spontaneous abortion, and microcephaly in newborns [6]. Microcephaly is

* Corresponding author at: Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, SLP, 78210, Mexico.

** Corresponding author at: Sección de Microscopía de Alta Resolución, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2^a. Sección, San Luis Potosí, 78210, Mexico.

E-mail addresses: mauricio.comas@uaslp.mx (M. Comas-García), rosales.s@uaslp.mx (S. Rosales-Mendoza).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2025.127941>

Received 7 September 2025; Received in revised form 21 October 2025; Accepted 30 October 2025

Available online 7 November 2025

0264-410X/© 2025 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.