

DISEÑO DE UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN COMO VACUNA BIVALENTE CONTRA LOS VIRUS ZIKA Y CHIKUNGUNYA: UN ENFOQUE BIOINFORMÁTICO

Daniel Misael Garza-García¹, Luis Jesús Galán-Wong¹, Benito Pereyra-Alfárez¹, José Antonio Fuentes-Garibay¹, Claudio Guajardo Barboza¹, Lucila Adriana Galán-Franco¹, Santiago Saavedra-Alonso¹, Baldemar Escobar-González¹, Jesús Gerardo Carreón-Treviño¹, Juan Antonio Gallegos-López^{1*}.

1. Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Pedro de Alba S/N, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

*Correspondencia: Juan Antonio Gallegos-López. Correo electrónico: juan.gallegoslp@uanl.edu.mx.

Resumen

Los virus Zika (ZIKV) y Chikungunya (CHIKV) representan un problema para la salud humana. El objetivo de este estudio fue diseñar mediante bioinformática una proteína de fusión (PF) como una vacuna bivalente contra estos virus. Las proteínas no estructurales del ZIKV y CHIKV se analizaron para predecir epítopos candidatos a vacuna, que se emplearon para diseñar la secuencia de la PF. Además, la PF se analizó para predecir sus propiedades fisicoquímicas, solubilidad, alergenicidad, similitud con proteínas humanas, estabilidad, estructura secundaria y terciaria. Se obtuvieron un epítipo de células B (MPVTHASAAQRRGR) y dos de células T (GEGRLDPYW, TMWHVTKGAAALRSGE) de la proteína NS3 de ZIKV. Además, se obtuvieron un epítipo de células B (KWPESFKNSATPVGTA) y dos de células T (ELAAAYREV, NHLFTAMDSTDADV) en la proteína nsP3 de CHIKV. La secuencia PF conformado con los epítopos identificados, mostró 103 residuos de aminoácidos, un punto isoeléctrico (pI) de 7.04, un peso molecular de 10.9 kDa, fue estable, soluble, no mostró similitud con las proteínas humanas y se clasificó como no alergénica. En este estudio, se diseñó mediante bioinformática una PF con el potencial de estimular una respuesta inmunológica contra el ZIKV y CHIKV. Sin embargo, se requerirán más estudios in vitro e in vivo para verificar la efectividad de la vacuna.

Palabras clave: Chikungunya, Zika, epítipo, vacuna bivalente, bioinformática

Abstract

The Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV) viruses represent a problem for human health. The objective of this study was to design a fusion protein (FP) as a bivalent vaccine against these viruses using bioinformatics. The non-structural proteins of ZIKV and CHIKV were analyzed to predict vaccine candidate epitopes, which were used to design the PF sequence. Furthermore, PF was analyzed to predict its physicochemical properties, solubility, allergenicity, similarity to human proteins, stability, secondary, and tertiary structure. One B-cell epitope (MPVTHASAAQRRGR) and two T-cell epitopes (GEGRLDPYW, TMWHVTKGAAALRSGE) were obtained from the NS3 protein of ZIKV. Additionally, one B-cell epitope (KWPESFKNSATPVGTA) and two T-cell epitopes (ELAAAYREV, NHLFTAMDSTDADV) were obtained from the nsP3 protein of CHIKV. The PF sequence composed with the identified epitopes showed 103 amino acid residues, an isoelectric point (pI) of 7.04, a molecular weight of 10.9 kDa, was stable, soluble, showed no similarity to human proteins and was classified as non-allergenic. In this study, a FP was designed using bioinformatics with the potential to stimulate an immune response against ZIKV and CHIKV. However, further in vitro and in vivo studies will be required to verify the effectiveness of the vaccine.

Keywords: Chikungunya, Zika, epitope, bivalent vaccine, bioinformatics

INTRODUCCIÓN

Los virus Zika (ZIKV) y Chikungunya (CHIKV) pertenecen a la familia Flaviviridae y Togaviridae, respectivamente. Estos virus son transmitidos a los humanos por mosquitos infectados, principalmente *Aedes aegypti*. El ZIKV produce la enfermedad conocida como fiebre de Zika, que incluye dolor en las articulaciones, dolor de cabeza, fiebre, erupción cutánea y conjuntivitis. El síndrome de Guillain-Barré también se ha asociado al ZIKV. Además, se ha sugerido la transmisión sexual del ZIKV en humanos. La principal preocupación es la microcefalia en neonatos causados por la infección del ZIKV en mujeres embarazadas (Song *et al.*, 2017). El virus del Zika tiene cápside icosaédrica, envoltura de membrana y glicoproteínas de superficie. El genoma de ZIKV está constituido por una sola cadena de ARN, con sentido positivo de cadena sencilla, de 10,700 pb. Codifica las proteínas no estructurales (NS1, NS3, NS5, NS2A, NS4A, NS2B y NS4B) y estructurales (C, E y prM/M) del virus (Al-Dawsari *et al.*, 2019). El ZIKV se aisló por primera vez en 1947 de monos Rhesus en los bosques de Zika, Uganda. En 1980, el ZIKV se había extendido a África y Asia. En 2014, se reportaron brotes del virus en la Isla de Pascua y en Chile. En 2015, se registró otro brote en Brasil y para 2016, el ZIKV se había extendido a gran parte del continente americano. El CHIKV causa la enfermedad conocida como fiebre de Chikungunya. Los síntomas de la infección por CHIKV son erupciones cutáneas, náuseas, fiebre, dolores musculares y articulares graves (De Lima Cavalcanti *et al.*, 2022). El virus Chikungunya es esférico y envuelto. Posee un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo, con un tamaño de 11,800 pb, que codifica cuatro proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) y cinco proteínas estructurales (C, E1, E2, E3 y 6K). En 1952 el CHIKV fue descubierto en Tanzania, África. Las infecciones continuaron en Asia hasta finales de la década de los setenta y desde el 2004 se reportaron brotes en islas del Océano Índico y posteriormente el virus se esparció en el continente americano. En la Región de las Américas, el CHIKV registró 410,754 casos y 419 muertes en 2023. En 2024, hasta la semana epidemiológica 14, se reportaron 186,274 casos y 60 muertes según la Organización Panamericana de la salud (OPS/OMS, 2024). En cuanto al virus Zika, durante 2023 se documentaron 55,813 casos y 4 defunciones y en 2024 se reportaron 40,891 casos, según los reportes actualizados de la Organización Panamericana de la Salud (PAHO, 2024). Actualmente, no existe una vacuna aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) contra ZIKV (Stinchcomb & Partridge 2018; Sanyaolu *et al.*, 2019). En cambio, sí existe una vacuna aprobada por la FDA contra el CHIKV. Por esta razón, es fundamental desarrollar una vacuna bivalente basada en péptidos que proteja contra la infección de ambos virus.

La disponibilidad cada vez mayor de genomas de microorganismos patógenos depositados en las bases de datos, así como de programas de la bioinformática, han permitido identificar epítomos con potencial de estimular una respuesta

inmunitaria contra diferentes patógenos, sin tener que cultivarlos en el laboratorio. Este nuevo enfoque, llamado vacunología inversa, es rentable y reduce el tiempo en la identificación de epítomos (Khalid & Poh, 2023; Ponne *et al.*, 2024; Shawan *et al.*, 2023). Este enfoque de la vacunología inversa ya ha sido comprobado experimentalmente con la vacuna desarrollada contra el meningococo del grupo B (MenB), la cual actualmente, se encuentra comercializada (Masignani *et al.*, 2019).

En este estudio, se diseñó mediante herramientas bioinformáticas una PF portadora de epítomos de células B y T derivados de las proteínas ns3 de ZIKV y nsP3 de CHIKV, con el potencial de estimular una respuesta inmune protectora contra ambos virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de secuencias aminoácídicas del ZIKV y CHIKV

Las secuencias de las proteínas no estructurales NS3 (ZIKV) y nsP3 (CHIKV), se obtuvieron de la base de datos de Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) con los números de acceso: Q32ZE1 y Q8JUX6, respectivamente.

Predicción de epítomos de células B y T

Se analizaron las proteínas no estructurales NS3 del ZIKV y nsP3 del CHIKV, con herramientas de predicción de epítomos de células B de la Base Datos de Epitope Inmune (IEDB) (<https://www.iedb.org/>). Primeramente, para predecir las regiones inmunogénicas se empleó la herramienta Bepipred de predicción de epítomos lineales del IEDB empleando un nivel de umbral de 0.35. Posteriormente, para identificar las regiones accesibles, se empleó la herramienta Emini de Predicción de Accesibilidad de Superficie del IEDB, usando un valor de umbral de 1.0. A continuación, la herramienta de predicción de Antigenicidad Kolaskar y Tongaonkar del IEDB, se utilizó para determinar los sitios antigénicos, empleando un umbral de 1.0. Finalmente, para detectar péptidos hidrofílicos, se usó el programa de Predicción de Hidrofilia de Parker del IEDB utilizando un nivel de umbral predeterminado (Vita *et al.*, 2018). Adicionalmente, para predecir epítomos de células T de las proteínas no estructurales NS3 del ZIKV y nsP3 del CHIKV, se empleó la herramienta de predicción de epítomos de células T del IEDB (Vita *et al.*, 2018).

Diseño de la proteína de fusión

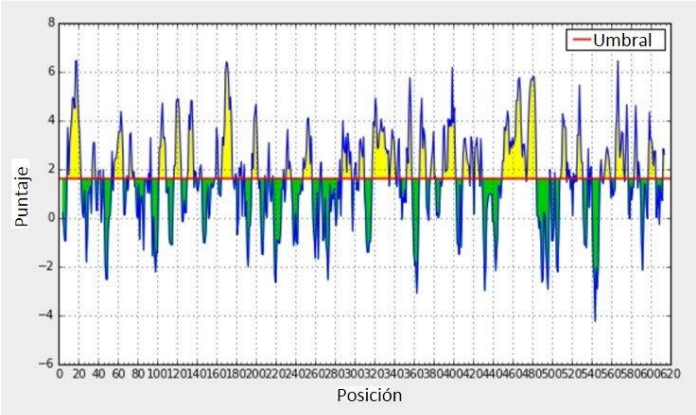
La secuencia de la PF se diseñó usando los epítomos identificados en las proteínas no estructurales del ZIKV y del CHIKV. Los epítomos identificados se unieron mediante un enlazador helicoidal con la secuencia aminoácídica EAAAK. Además, la PF se analizó con el programa PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), para la predicción de la estructura secundaria. Así mismo, el modelo de la estructura tridimensional de la proteína de fusión se predijo utilizando el servidor AlphaFold (<https://alphafoldserver.com/>) mediante la metodología previamente descrita por Jumper y colaboradores (Jumper *et al.*, 2021).

Tabla 1. Péptidos inmunogénicos de la proteína NS3 de ZIKV y de la proteína nsP3 de CHIKV, sugeridos por el programa de predicción de inmunogenicidad Bepipred Linear Epitope Prediction del IEDB.

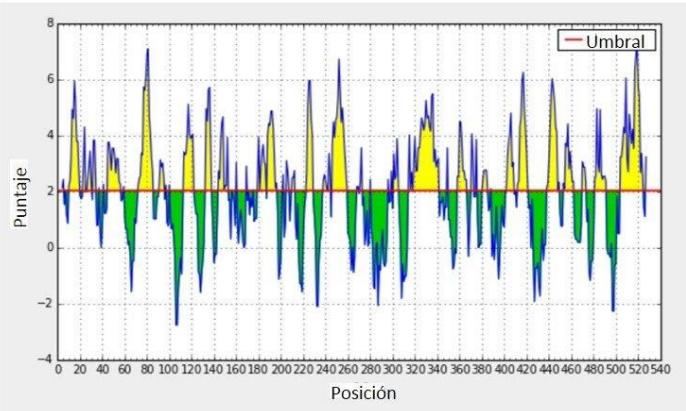
NS3 de ZIKV		nsP3 de CHIKV	
Péptido	Longitud (aa)	Péptido	Longitud (aa)
LWDVPAPKEVKKGETTDG	18	APSY	4
ALRSGEGRDPYWGDV	16	IAKNDEEC	8
K	1	AANPRGLPGDGV	12
A	1	KWPESFKNSATPVGTA	16
D	1	PNFSNYSESEGDREL	15
VPPGERARN	9	VYSGGKDRL	9
KTKDGI	7	DSTDA	5
DYPAGTSGSPIL	12	KEWEKK	6
TQ GKREEETPVEC	13	VHPDSSLAGRKGYSTTEG	18
PGAGKTR	7	F	1
VTHS	4	PKQTEAN	7
T	1	KCPVDDADASSPPKTV	16
V	1	E	1
HFTDPSSIA	9	L	1
EM	2	Y	1
ATPPGTRDAFPDSNSPIMDTEVEVPERA WSS	31	I	1
DWVTDHSG	8	VPSRVSPREYRPSQESVQEASTTT SL	26
VRNGN	5	LPVPSDLADAPALEPALDDG	21
TEFQKTKNQE	10	IHTLPSATGNLA	12
SE	2	VPVAPRRRRRG	11
N	1	DEREGNIT	8
MPVTHASAAQRRGRIGRNPNKPGDEYM YGGGCAETDEGHA	40	QETAETRDTAMSLQAPPSTATELS HPPISFGAPSETFP	38
RPEADKVAA	9	DFNEGEIES	9
E	1	PGEVDDLTDSDWSTCSDTDELRL	23
ITY	3		
GTTNNTIMEDSVPAEVWTKY	20		

Tabla 2. Predicción de péptidos accesibles de la proteína NS3 de ZIKV y de la proteína nsP3 de CHIKV, sugeridos por el programa de predicción de accesibilidad Emini Surface Accessibility Prediction del IEDB.

NS3 de ZIKV		nsP3 de CHIKV	
Péptido	Longitud (aa)	Péptido	Longitud (aa)
PAPKEVKKGET	11	VYKKWPESFKNS	12
PGERARNI	8	FSNYSESEGD	10
QGKREEET	8	GGKDRL	6
SMLKKKQ	7	RDKEWEKKI	9
GKTRRV	6	RKGYSTT	7
AIKKRL	6	MWPKQTEAN	9
ATPPGT	6	AMTPERT	8
DAFPDSN	7	RVSPREYRPSQESV	14
LSRKTFETEFQKTKNQE	17	APPRRRRGR	9
AAQRRGR	7	ETAETRDT	8
GRNPKNPGDEY	11	DTDDELRL	7
LYRPEA	6		
FKLRTEQRKT	10		
PAPKEVKKGET	11		



a)



b)

Figura 1. Análisis de hidrofiliidad de las proteínas NS3 (ZIKV) y nsP3 (CHIKV). a) Posiciones de los residuos de aminoácidos hidrofílicos (en amarillo) de la proteína NS3 de ZIKV que se ubicaron por encima del umbral de hidrofiliidad (1.602). b) Posiciones de los residuos de aminoácidos hidrofílicos (en amarillo) de la proteína nsP3 de CHIKV que superaron el umbral establecido (2.040).

Tabla 3. Predicción de sitios antigénicos de las proteínas NS3 y nsP3 de ZIKV y CHIKV, respectivamente, sugeridos por la herramienta de predicción de antigenicidad Kolaskar y Tongaonkar del IEDB.

NS3 de ZIKV		nsP3 de CHIKV	
Péptido	Longitud (aa)	Péptido	Longitud (aa)
LWDVPAPKE	9	EECVVNAA	8
LLGSTQVGVGVMQEGVFHTMW	21	GDGVCKAVYKK	11
KQDLVSYCGPW	11	ATPVGTA	7
LSEVQLLAVPPG	12	TVMCGTYPVIHAVGP	15
IQTLPGI	7	LAAAYREVAKEVTRLGVNSVAIPLLSTGVYSG	32
IGAVALDYP	9	TQSLNHLFTA	10
SPILDKCGRVIGL	13	ADVVIYCR	8
GNGVVIKNGSYVSAI	15	QVELLDEHISIDCDVVRVHPDSS	23
PVECFEPS	8	GALYSYL	7
KKQLTVLDLHPG	12	EQVCLYALGES	11
RRVLPEIVREA	11	RQKCPVDDA	9
LRTVILAPTRVVAA	14	SSPPKTVPCLCRYA	14
LRGLPVRYMTTAVNVT	16	VTSIIVCSSFPLPKY	15
TEIVDLMCHAT	11	IEGVQKVKCSKVMLFDHNVPSRVSPR	26
TSRLQPIRVPNY	13	QESVQEA	7
TDPSSIAARGY	11	SLTHSQFDLSVDGKILPVPSD	21
AAIFMT	6	ADAPALEPA	9
GKTWVFPVSV	10	IHTLPS	6
IAACLTk	7	NLAAVSDW	8
KRVIQLSR	8	MSTVPVAPP	9
DFVITT	6	MASVRFFRAELCPVVQE	17
DRVIDSRRCLKPVILDGERVILAGPMPVTHASA	33	SLQAPPS	7
DNIYLQDGLIASLYRP	16	ATELSHPPISFG	12
ADKVAAI	7		
KTFVEL	6		
DLPVWLAYQVASAGI	15		
EDSVPAEVWTK	11		
EKRVLKP	7		
ARVCSDHAALKSF	13		

Propiedades fisicoquímicas de la proteína de fusión

Se utilizó el programa ProtParam Tool (<https://web.expasy.org/protparam/>), para estimar las propiedades fisicoquímicas de la PF. Además, se calculó la solubilidad mediante el programa Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>). Posteriormente, para predecir la alergenicidad de la PF, se empleó el programa AlgPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/algpred/submission.html>). Luego, se utilizó la herramienta de BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para calcular la similitud entre la secuencia de la PF y la secuencia de proteínas humanas (Zaru & Orchard, 2023).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de péptidos inmunogénicos

El programa Bepipred identificó 26 y 24 péptidos en la proteína NS3 del ZIKV y nsP3 de CHIKV, respectivamente. Estos péptidos mostraron valores por encima del nivel de umbral de 0.35, por lo que fueron considerados inmunogénicos (Tabla 1).

Predicción de péptidos accesibles

La herramienta Emini de Predicción de Accesibilidad de Superficie del IEDB, identificó 14 y 11 péptidos en las proteínas NS3 de ZIKV y nsP3 de CHIKV, respectivamente. Dichos péptidos presentaron valores por encima del valor del umbral de 1.0, por lo que fueron considerados como accesibles (Tabla 2).

Detección de péptidos antigénicos

La herramienta de predicción de Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar del IEDB encontró 29 y 23 péptidos en las proteínas NS3 de ZIKV y nsP3 de CHIKV, respectivamente, con un valor por encima del nivel del umbral de 1.0, por lo que fueron considerados antigénicos (Tabla 3).

Determinación de péptidos hidrofílicos

El programa de Predicción de Hidrofilia de Parker del IEDB 8 identificó aproximadamente 26 y 31 péptidos en las proteínas NS3 (ZIKV) y nsP3 (CHIKV), respectivamente, dichos péptidos mostraron valores por encima del umbral predeterminado, por lo que fueron considerados como péptidos hidrofílicos (Figura 1).

Péptidos candidatos a vacuna

Para que un péptido pueda llegar a ser una vacuna, este deberá ser accesible inmunogénico, hidrofílico y antigénico. Los análisis de las proteínas no estructurales de ZIKV y CHIKV, con las herramientas del IEDB, mostraron que solo las proteínas NS3 de ZIKV y nsP3 de CHIKV poseen un péptido en su secuencia con dichas características, por lo que fueron seleccionados para el diseño de la secuencia de la PF (Tabla 4).

Epítomos de células T

El análisis de la proteína NS3 de ZIKV con la herramienta T cell epitope prediction del IEDB, predijo el epítipo de células T:

GEGRDPYW, perteneciente a la clase Complejo Mayor de Histocompatibilidad I (MHC I, por sus siglas en inglés), además se predijo el epítipo de células T clase MHCII: TMWHVTGAALRSGE. Similarmente, el análisis de la proteína nsP3 de CHIKV, con dicha herramienta, predijo un epítipo de células T clase MHC I: ELAAAYREV y el epítipo de células T clase MHCII: NHLFTAMDSTDADV.

Diseño de la proteína de fusión

Se obtuvo la secuencia de la PF portando los epítomos identificados de células B y T (MHC I y MHCII), tanto de la proteína NS3 de ZIKV, como de la proteína nsP3 de CHIKV, unidos mediante un enlazador helicoidal con la secuencia aminoacídica EAAK (Figura 2a). La estructura secundaria de la PF (Figura 2b) mostró siete hélices α , 9 giros y una tira beta. La Figura 2a muestra el modelo estructural de la PF generada con el programa Alphafold.

Propiedades fisicoquímicas de la proteína de fusión

La PF mostró 103 residuos de aminoácidos, un peso molecular aproximado de 10.9 kDa, un punto isoelectrico de 7.04. El valor de la solubilidad de la PF fue de 0.751, lo que indica una alta solubilidad. El índice de inestabilidad se calculó en 31.50, lo que clasifica la proteína de fusión como estable. El análisis de la PF con el programa AlgPred clasificó a la PF como no alergénica. El programa BLASTp no encontró similitud entre la secuencia de la PF y secuencia de proteínas de humano.

Discusión

El ZIKV puede causar complicaciones tales como el Síndrome de Guillain-Barré, el Síndrome Congénito por ZIKV (Microcefalia), en raras ocasiones puede ocasionar la muerte y carece de una vacuna aprobada. El CHIKV puede causar artritis crónica y en raras ocasiones complicaciones graves como manifestaciones neurológicas (meningoencefalitis), oculares o cardiovasculares y la muerte (en los grupos de riesgo). Por tal motivo, se decidió diseñar una vacuna in silico bivalente con base en las proteínas no estructurales de ZIKV y CHIKV.

Está ampliamente documentado que las proteínas no estructurales de los virus poseen ventajas, cuando se emplean como antígenos vacunales. Entre ellas destacan: a) menor tasa de mutación, lo que dificulta que el virus desarrolle resistencia viral a la vacuna, b) presencia de regiones conservadas lo que puede conferir protección cruzada contra virus de la misma familia (Al-Dawsari *et al.*, 2019; Elong Ngono *et al.*, 2020), c) capacidad de inducir memoria celular a largo plazo, d) estimulación de linfocitos T citotóxicos, responsables de eliminar células infectadas con virus, (Lopera-Henao *et al.*, 2017). e) pueden reducir el riesgo del fenómeno de Aumento Dependiente de Anticuerpos (ADE). En este estudio se empleó el enfoque de la vacunología inversa para diseñar una PF basada en epítomos de las proteínas no estructurales NS3 de ZIKV y nsP3 de CHIKV, para estimular una

Tabla 4. Péptidos candidato a vacuna de la proteína NS3 de ZIKV y nsP3 de CHIKV.

Análisis	Péptidos de NS3 de ZIKV	Péptidos de nsP3 de CHIKV
Inmunogenicidad	MPVTHASAAQRRGRIGRNPKNKPGD EYMYGGGCAETDEGHA	KWPESFKNSATPVGTA
Accesibilidad	AAQRRGR	VYKKWPESFKNS
Antigenicidad	DRVIDSRRLKPKVILDGERVILAGPM PVTHASA	ATPVGTA
Hidrofilia	QRRGR	FKN..ATP
Péptido candidato a vacuna	MPVTHASAAQRRGR	KWPESFKNSATPVGTA

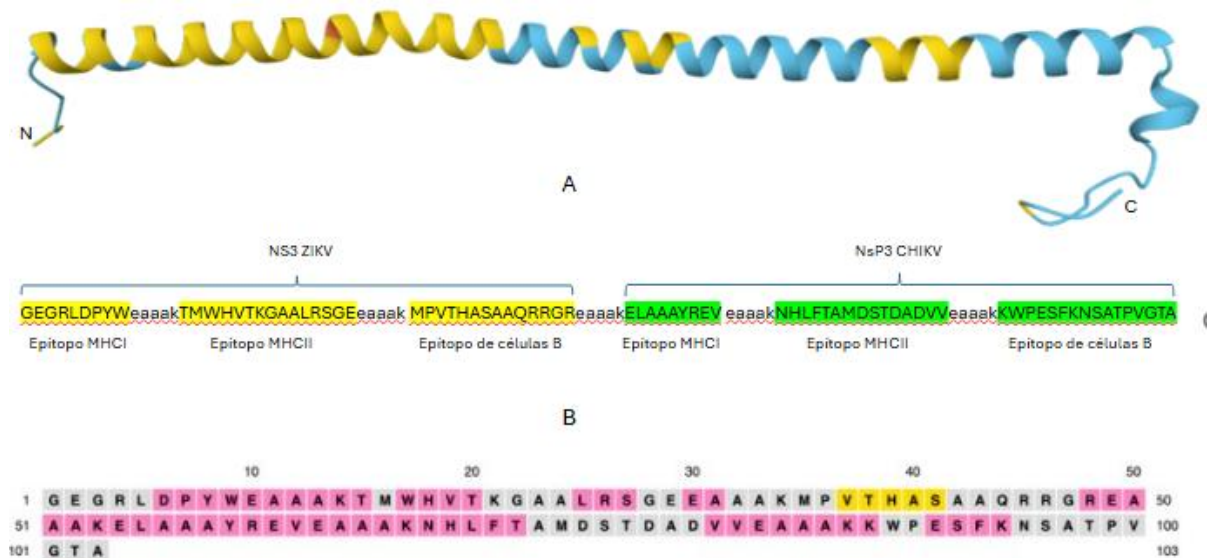


Figura 2. Diseño de la PF. a) Estructura tridimensional de la PF con el programa AlphaFold. b) secuencia portadora de los epítomos identificados en las proteínas NS3 (ZIKV) y nsP3 (CHIKV), unidos mediante un enlazador helicoidal EAAK. c) Estructura secundaria de la PF.

respuesta inmunológica contra dichos virus. Dado que esta reportado que el uso de varios antígenos puede aumentar la efectividad de una vacuna, se diseñó una PF utilizando una metodología similar a la empleada por Antonelli y colaboradores quienes en 2022 diseñaron una vacuna multiepitopo contra el ZIKV (Antonelli *et al.*, 2022). Además, para unir los epítomos seleccionados del presente estudio, se empleó el enlazador helicoidal EAAK, ya que los enlazadores helicoidales controlan mejor la distancia y la interferencia entre los dominios de las proteínas fusionadas, en comparación con otro tipo de enlazadores (Chatrdooz & Sargolzaei, 2025).

Las herramientas de predicción de epítomos de células B del IEDB, predijeron varios epítomos, pero solo se seleccionó el epítopo MPVTHASAAQRRGR de la proteína NS3 de ZIKV y el epítopo KWPESFKNSATPVGTAK en la proteína nsP3 de CHIKV, por haber resultado inmunogénicos, antigénicos, accesibles e hidrofílicos. La inmunogenicidad se define como la capacidad de un epítopo para estimular la producción de anticuerpos, mientras que la antigenicidad corresponde a su capacidad para unirse específicamente a dichos anticuerpos (Fishman *et al.*, 2015). Adicionalmente, los epítomos seleccionados demostraron ser accesibles e hidrofílicos, lo que indica que se encuentran

expuestos a los anticuerpos y la unión del anticuerpo con su antígeno, podría estimular una respuesta inmunológica (Afshari *et al.*, 2023).

La herramienta BLASTp, no encontró similitud entre la secuencia de la proteína de fusión y secuencias de proteínas humanas. Además, los análisis de alergenicidad de la PF con el programa AlgPred, clasificó a la PF como no alergénica. Lo anterior indica que es poco probable que la proteína de fusión induzca autoinmunidad o alergia. Las características más importantes de los epítomos de células B identificados en NS3 de ZIKV y nsP3 de CHIKV fueron su inmunogenicidad, su antigenicidad y su accesibilidad. Así mismo, como la antigenicidad los epítomos de células T encontrados en dichas proteínas.

En un estudio similar se evaluó la eficacia de una vacuna de ADN codificante de la proteína no estructural NS1 del virus del Dengue serotipo 2, la cual confirió protección a ratones contra dicho virus, mediante una respuesta inmunológica humoral y celular (Wu *et al.*, 2023). En otro estudio Elong Ngono y colaboradores diseñaron en el año 2020 una vacuna basada en la proteína NS3, la cual generó células CD8⁺ polifuncionales que previnieron la mortalidad y el daño fetal en modelos murinos cuando fueron retados con el ZIKV, incluso sin anticuerpos neutralizantes detectables, lo que destacó su potencial como antígeno para vacunas centradas en inmunidad celular (Elong Ngono *et al.*, 2020).

Diversos estudios han reportado múltiples epítomos lineales prometedores, lo que posiciona a nsP3 como un blanco viable para el diseño de vacunas multiepítomo (Sánchez-Burgos *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los obtenidos por dos Santos Franco y colaboradores quienes en 2017 desarrollaron in silico una vacuna basada en una secuencia consenso de la proteína NS5 de ZIKV, a partir de la cual identificaron 19 epítomos con un 100% de conservación entre DENV y ZIKV. Dicha vacuna presentó un alto potencial para inducir una respuesta inmune celular protectora contra DENV y ZIKV (dos Santos Franco *et al.*, 2017).

Las características más importantes de la PF diseñada en el presente estudio fueron la inmunogenicidad, la antigenicidad y la accesibilidad de los epítomos de células B identificados en las proteínas NS3 de ZIKV y nsP3 de CHIKV. Así mismo, se consideraron los epítomos de células T, tanto de MHC I como de MHC II, presentes en estas mismas proteínas. Estos resultados sugieren que los epítomos identificados en el presente estudio podrían estimular una respuesta inmunológica contra las proteínas no estructurales NS3 de ZIKV y nsP3 de CHIKV.

CONCLUSIONES

En este estudio se diseñó por primera vez, mediante vacunología inversa, una proteína de fusión con el potencial para estimular una respuesta inmunológica contra el ZIKV y el CHIKV. Además, los

análisis sugieren que la PF posee baja probabilidad de inducir autoinmunidad o reacciones alérgicas. No obstante, serán necesarios estudios adicionales, tanto in vitro como in vivo, para confirmar la seguridad y la eficacia de este candidato vacunal.

AGRADECIMIENTOS

A los LBGs Isaac Durón y a Uziel Tlahuiz, por la ayuda aportada.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Afshari, E., Cohan, R. A., Sotoodehnejadnematalahi, F., & Mousavi, S. F. (2023). In-silico design and evaluation of an epitope-based serotype-independent promising vaccine candidate for highly cross-reactive regions of pneumococcal surface protein A. *Journal Of Translational Medicine*, 21(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03864-z>
2. Al-Dawsari, A. M., Gholami, M., & Aftab, A. (2019). Zika virus nonstructural proteins: New targets for drug and vaccine development. *Journal of Medical Virology*, 91(12), 2133–2142. <https://doi.org/10.1002/jmv.25556>
3. 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>
4. Chatrdooz, H., & Sargolzaei, J. (2025). An Overview of Property, Design, and Functionality of Linkers for Fusion Protein Construction. *Proteins Structure Function And Bioinformatics*, 93(9), 1411-1425. <https://doi.org/10.1002/prot.26812>
5. De Lima Cavalcanti, T. y. V., Pereira, M. R., De Paula, S. O., & De Oliveira Franca, R. F. (2022). A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. *Viruses*, 14(5), 969. <https://doi.org/10.3390/v14050969>
6. Elong Ngono, 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>
7. Fishman, J. M., Wiles, K. & Wood, K. J. (2015). The acquired immune system response to biomaterials, including both naturally occurring and synthetic biomaterials. *Academic Press* (Ed.). *Host Response to Biomaterials* (pp. 151-187) Elsevier BV. [Doi.org/10.1016/B978-0-12-800196-7.00008-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800196-7.00008-6)
8. Franco, L. D. S., Vidal, P. O., & Amorim, J. H. (2017). In silico design of a Zika virus non-structural protein 5 aiming vaccine protection against zika and dengue in different human populations. *Journal Of Biomedical Science*, 24(1), 88.

<https://doi.org/10.1186/s12929-017-0395-z>

9. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589 (2021).

10. Khalid, K., & Poh, C. L. (2023). The Promising Potential of Reverse Vaccinology-Based Next-Generation Vaccine Development over Conventional Vaccines against Antibiotic-Resistant Bacteria. *Vaccines*, 11(7), 1264. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071264>

11. Lopera-Henao, F., Agudelo, S., Rangel, H. R., Ruiz, S. Á., Ramírez-Pineda, J. R., & Ospina, M. (2017). DNA-based vaccination with NS3/NS5 of dengue virus is superior to NS1-based vaccination in inducing T cell responses and protection in mice. *Vaccine*, 35(26), 3469–3476. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.006>

12. Massignani, V., Pizza, M. & Moxon, E.R. (2019). The Development of a Vaccine Against Meningococcus B Using Reverse Vaccinology. *Front Immunol.* 10, 751. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00751>

13. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. (2024). Actualización Epidemiológica: Chikunguña en la Región de las Américas. 22 de abril del 2024. Washington, D.C.: OPS/OMS.

14. Pan American Health Organization (PAHO). (2024). Zika Situation Reports. Washington, D.C.: PAHO. [Cita de los informes de situación epidemiológica periódicos que consolidan los datos de los países miembros].

15. Ponne, S., Kumar, R., Vanmathi, S., Brilhante, R. S. N., & Kumar, C. R. (2024). Reverse engineering protection: A comprehensive survey of reverse vaccinology-based vaccines targeting viral pathogens. *Vaccine*, 42(10), 2503–2518. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.02.087>

16. Sánchez-Burgos, G. G., Montalvo-Marin, N. M., Díaz-Rosado, E. R., & Pérez-Rueda, E. (2021). In Silico Identification of Chikungunya Virus B- and T-Cell Epitopes with High Antigenic

Potential for Vaccine Development. *Viruses*, 13(12), 2360. <https://doi.org/10.3390/v13122360>

17. Sanyaolu, A., Ayodele, O., Likaj, L., Marinkovic, A., Locke, J., Ahmed, M. & Badaru, O. (2019). Changing Epidemiology, Treatment, and Vaccine Update on Chikungunya, Dengue, and Zika Viruses. *Current Tropical Medicine Reports*, 6(3), 145–159. [Doi.org/10.1007/s40475-019-00181-2](https://doi.org/10.1007/s40475-019-00181-2)

18. 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>

19. Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M. & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of neuroimmunology*, 308, 50–64. [Doi: 1016/j.jneuroim.2017.03.001](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001)

20. Stinchcomb, D. T., & Partridge, B. (2018). Dengue and Zika virus vaccines: What we have and what we need. *Current Opinion in Virology*, 33, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.06.002>

21. Vita, R., Mahajan, S., Overton, J.A., Dhanda, S.K., Martini, S., Cantrell, J.R., Wheeler, D.K., Sette, A. & Peters, B. (2018). The immune epitope database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 47(D1), D339–D343. [Doi:10.1093/nar/gky1006](https://doi.org/10.1093/nar/gky1006)

22. Wu, S. F., Liao, C. L., Lin, Y. L., Yeh, C. T., Chen, L. K., Huang, Y. F., ... & Sytwu, H. K. (2003). Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine*, 21(25-26), 3919–3929.

23. Zaru, R., & Orchard, S. (2023). UniProt Tools: BLAST, Align, Peptide Search, and ID Mapping. *Current Protocols*, 3(3), e697. <https://doi.org/10.1002/cpz1.697>