



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PRODUCCIÓN, INACTIVACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL VIRUS DEL ZIKA PARA SU EVALUACIÓN EN FORMULACIONES DE VACUNAS MUCOSALES

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

TESIS QUE PRESENTA
IFB. MIRANDA LÓPEZ ARLETH

DIRECTORES DE TESIS
DR. SERGIO ROSALES MENDOZA
DR. MAURICIO COMAS GARCÍA

DICIEMBRE, 2021

Créditos Institucionales

El programa de maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 003383, en el nivel en desarrollo. Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 1008027.

Para la realización de este trabajo se contó con la aportación del proyecto “Evaluación preclínica de vacunas quiméricas contra el SARS-CoV2” con número de actividad No. CONACYT Pp F003 S/XV-E/2021.



Producción, inactivación y purificación del Virus del Zika para su evaluación en formulaciones de vacunas mucosales por Miranda López Arleth se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Tesis que presenta
IFB. Miranda López Arleth

Para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

Jurado

Dr. Sergio Rosales Mendoza

Dr. Mauricio Comas García

Dra. Gabriela Navarro Tovar

Dra. Claudia Castillo Martín del Campo

INTEGRANTES DEL SUBCOMITÉ DE TESIS

Directores de tesis

Dr. Sergio Rosales Mendoza
Facultad de Ciencias Químicas-UASLP

Dr. Mauricio Comas García
Facultad de Ciencias-UASLP

Asesora del posgrado

Dra. Gabriela Navarro Tovar
Facultad de Ciencias Química-UASLP

San Luis Potosí, S.L.P.
Diciembre, 2021

**Comité Académico del Posgrado
En Ciencias Farmacobiológicas
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Maestría IFB. Arleth Miranda López, titulada “Producción, inactivación y purificación del Virus del Zika para su evaluación en formulaciones de vacunas mucosales”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día Jueves 16 de diciembre a las 12 hrs. en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.

ATENTAMENTE

Dr. Sergio Rosales Mendoza
Director de Tesis

Dr. Mauricio Comas García
Director de Tesis

Dra. Gabriela Navarro Tovar
Asesor

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mi familia, especialmente a mis padres por todo el apoyo incondicional, a mi hermano por estar conmigo en todo momento y a mami por siempre creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio Rosales y al Dr. Mauricio Comas por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por confiar en mí para la realización de este proyecto.

A la Dra. Claudia Castillo, por permitirme trabajar en su laboratorio y a la Dra. Gabriela Navarro por asesorarme en todo este trabajo.

A Edson, Dania, Sara y Yolanda, por el apoyo y paciencia brindada.

RESUMEN

El virus del Zika (ZIKV) perteneciente a la familia *Flaviviridae* se transmite generalmente mediante artrópodos, aunque también por contacto sexual y de forma vertical durante el embarazo. Este es un virus de RNA monocatenario positivo el cual da lugar a tres proteínas estructurales (proteínas C, M, y E) y siete no estructurales. El problema principal de este patógeno radica en la asociación con el desarrollo de microcefalia en niños y el desarrollo del síndrome de Guillain-Barré en adultos, siendo ambas las complicaciones más graves de la infección. Dada esta situación, en 2016 La Organización Mundial de la Salud lo declaró un problema grave de salud pública a nivel mundial, lo que hace que el desarrollo de vacunas sea una tarea urgente para abatir el impacto de este patógeno. En la actualidad, no hay vacunas aprobadas para su uso en humanos o tratamientos médicos específicos, y ambos aspectos suponen metas relevantes para la investigación biomédica.

En este trabajo se evaluaron diferentes métodos para la propagación, inactivación y purificación del virus del Zika a partir de un clon infeccioso ZIKA-ICD aislado de la cepa Paraiba_01/2015 en Brasil. La producción viral se realizó en la línea celular Vero E6 y se demostró que ZIKV-ICD induce vacuolización citoplasmática masiva; mediante ensayo en placa se comprobó que la propagación viral se da de forma similar en DMEM y Opti-MEM. Sin embargo, el virus producido en Opti-MEM y purificado por ultracentrifugación exhibió una adecuada pureza. Por otra parte, se demostró que las partículas virales se inactivan por completo, cuando se exponen con formaldehído al 0.02% durante 15 días a 22°C. Finalmente, mediante dot blot y SDS-PAGE se identificó la presencia de la proteína E con un peso de ≈ 67 kDa. En conjunto, nuestro trabajo propone una alternativa de propagación, purificación e inactivación del virus Zika, la cual, puede formar parte de una formulación vacunal contra este patógeno.

Palabras clave: ZIKV, proteína E, DMEM, Opti-MEM, células Vero E6, formaldehído, ultracentrifugación.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) belongs to the *Flaviviridae* family and is generally transmitted by arthropods, sexual intercourse and vertically during pregnancy. It has a positive single-stranded RNA genome that gives rise to three structural proteins (proteins C, M, and E) and seven non-structural proteins. The main problem of this pathogen relies on its association with the development of microcephaly in children and the development of Guillain-Barré syndrome in adults as the most serious complications of Zika infection. Given this situation, in 2016 The World Health Organization declared it a serious public health problem worldwide, which makes the development of vaccines to combat the impact of this pathogen an urgent task. Currently, there are no vaccines approved for the use in humans or specific medical treatments, which are relevant goals for biomedical research.

In this work, different methods for the propagation, inactivation, and purification of the Zika virus from an infectious ZIKA-ICD clone isolated from the Paraiba_01/2015 strain in Brazil were evaluated. Viral production was performed in the Vero E6 cell line, and it was demonstrated that ZIKV-ICD induces massive cytoplasmic vacuolization; by plaque assay, it was proved that viral propagation occurs similarly in DMEM and Opti-MEM. However, the virus produced in Opti-MEM and purified by ultracentrifugation exhibited better purity. Moreover, it was demonstrated that the viral particles were completely inactivated when exposed with 0.02% formaldehyde for 15 days at 22°C. Finally, by using dot blot and SDS-PAGE we identified the presence of the E protein with a molecular weight of ≈ 67 kDa. Overall, our work proposes an alternative for propagation, purification, and inactivation of the Zika virus, which can be part of a vaccine formulation against this pathogen.

Keywords: ZIKV, E protein, DMEM, Opti-MEM, Vero E6 cells, formaldehyde, ultracentrifugation.

INDÍCE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
III. JUSTIFICACIÓN.....	11
IV. HIPÓTESIS.....	11
V. OBJETIVO GENERAL.....	11
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	12
VIII.RESULTADOS	17
IX. DISCUSIÓN.....	27
X. CONCLUSIONES	33
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	34

I. INTRODUCCIÓN

Los flavivirus pertenecen a la familia *Flaviviridae*. Estos son virus con geometría icosaédrica envueltos de genoma de RNA monocatenario de sentido positivo, los cuales se transmiten generalmente mediante artrópodos. Dentro de las 53 especies que comprende este género, se encuentra el virus del Zika (ZIKV), el virus del dengue (DENV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del Nilo Occidental (WNV) y el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV) (Javed et al., 2018).

El ZIKV se transmite principalmente por el mosquito *Aedes Aegypti*, siendo ese artrópodo el vector de múltiples enfermedades de importancia internacional. El brote más grande de la historia ocurrió en Brasil del 2015; gracias a este brote la infección causada por este virus se asoció con un aumento en el número de malformaciones congénitas en recién nacidos (por ejemplo, microcefalia) y con el desarrollo del Síndrome de Guillain-Barré en adultos (Javed et al., 2018; Nazerai et al., 2019). Dada esta situación en 2016 La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo declaró un problema grave de salud pública a nivel mundial, lo que hace una tarea urgente el desarrollo de vacunas que abata el impacto de este patógeno (WHO, 2021).

En la actualidad no hay vacunas aprobadas para su uso en humanos o tratamientos específicos, lo cual supone una meta relevante para la investigación biomédica. La mayoría de las vacunas empleadas en la actualidad para combatir las enfermedades infecciosas se administran por vía parenteral. Sin embargo, esto requiere personal capacitado y dispositivos estériles para su aplicación, causan molestias al paciente y tienen un costo elevado de producción (Rosales-Mendoza & González-Ortega, 2019).

Teniendo en cuenta que la mayoría de los patógenos inician la infección en las superficies de mucosas (tracto respiratorio, intestinal y genital), el proteger estos tejidos mediante la inducción de la respuesta inmune humoral a nivel local en los compartimentos de mucosas es una meta de gran relevancia para la vacunología (Miquel-Clopés et al., 2019; Rosales-Mendoza & González-Ortega, 2019). Uno de los sitios más atractivos para la vacunación de la mucosa es la ruta intranasal, ya que, a

diferencia de la ruta oral, el antígeno no es expuesto al pH extremo estomacal ni a las enzimas digestivas; lo que permite usar dosis más bajas de antígeno y lograr una mayor eficacia. El uso de adyuvantes específicos es otro requerimiento para el diseño de vacunas de mucosas exitosas, siendo la toxina del cólera y toxina termo-lábil de *E. coli* dos ejemplos prominentes (Miquel-Clopés et al., 2019).

II. ANTECEDENTES

II.I Historia, estructura, síntomas, vías de transmisión y enfermedades relacionadas con el Virus del Zika

El ZIKV se aisló por primera vez en 1947 a partir de un mono *Rhesus (Macaca mulatta)* en Uganda. El primer brote en humanos se notificó en 2007 en la Isla Yap, infectando aproximadamente al 70% de la población; el número de contagios incremento en 2013, cuando la Polinesia Francesa reportó casos con infecciones graves. Sin embargo, el brote más importante sucedió en Brasil del 2015, más de 1.5 millones de personas fueron infectadas. A partir de ese año, este virus se consideró un problema de salud grave (Kindhauser et al., 2016).

El Zika es un arbovirus (**arthropod-borne-virus**), pertenece a la familia *Flaviviridae*, del género *flavivirus*. Es un virus de tipo icosaédrico envuelto y RNA monocatenario positivo con un tamaño aproximado de 11 kb, el diámetro de su virión es entre los 50-60 nm y su genoma codifica para una poliproteína que da lugar a tres proteínas estructurales (proteínas C, M y E) y siete no estructurales (proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Javed et al., 2018).

Se ha documentado la presencia de tres linajes predominantes: África Occidental, África Oriental y asiático. Aunque, la cepa africana es la más virulenta, la infección no se ha relacionado con algún defecto congénito; por el contrario, la cepa asiática es menos virulenta y se ha asociado con defectos congénitos del Sistema Nervioso Central y con posibles alteraciones cognitivas en adultos (Beaver et al., 2018).

El ZIKV se transmite principalmente por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*, pero, se ha informado que existen otras formas de transmisión: vía sexual, vía vertical y transfusión sanguínea (Nazerai et al., 2019). Aproximadamente el 80% de las infecciones son asintomáticas y el 20% presenta manifestaciones leves: ojos enrojecidos, dolor de cabeza, sarpullido, conjuntivitis, fiebre, dolor muscular, y dolor en las articulaciones. Estos síntomas duran de 2-7 días y el período de incubación oscila entre 3-12 días (Poland et al., 2018).

Uno de los problemas más importantes relacionados a este patógeno radica en la asociación con el desarrollo de microcefalia en niños y el desarrollo del Síndrome de Guillain-Barré en adultos, siendo ambas las complicaciones más graves de la infección (Javed et al., 2018). En México, de 2015 a 2020 la Secretaría de Salud registró 12,980 casos de Zika, de los cuales, 7,145 se presentaron en mujeres embarazadas, 56 de estos están relacionados al desarrollo de malformaciones congénitas, en su mayoría microcefalia y 19 con Síndrome de Guillain-Barré (Salud, 2021).

II.II Vacunas candidatas en desarrollo contra el Virus del Zika

A pesar de que este arbovirus se ha convertido en una preocupación para la salud pública, actualmente no existen tratamientos específicos para interrumpir el ciclo viral; todos los tratamientos se han centrado en aminorar los síntomas (Javed et al., 2018).

A partir del brote en Brasil, la lucha por descubrir un tratamiento terapéutico y/o profiláctico contra este patógeno ha llevado a grupos de investigación de todo el mundo a aunar esfuerzos para combatir la infección. Las investigaciones realizadas para el desarrollo de vacunas contra el virus del dengue, el virus de la fiebre amarilla y el virus de la encefalitis japonesa han servido de base para el diseño de vacunas candidatas contra este virus (Poland et al., 2018). Por lo tanto, la elección de una plataforma vacunal adecuada es fundamental para garantizar su eficacia y seguridad.

La investigación y el desarrollo de candidatos vacunales contra este virus incluye una variedad de plataformas: vacunas vivas atenuadas, inactivadas, ácidos nucleicos, vectores virales y partículas similares a virus (Pattnaik et al., 2020). El panorama mundial de las vacunas contra ZIKV de acuerdo con la OMS, a finales de 2020, incluye 20 candidatos en ensayos clínicos, de los cuales 18 se encuentran en fase I y 2 en fase II (Tabla 1) (Castanha & Marques, 2020; Pattnaik et al., 2020; WHO, 2020). Es importante indicar, que el 100% emplea la vía de administración parenteral y aproximadamente el 35% utiliza sales de aluminio como adyuvante.

Tabla 1. Vacunas candidatas contra Virus del Zika en desarrollo

Fase de ensayo	Plataforma	Nombre	Número de registro	Instituto/ compañía
II	DNA	VRC5283	NTC03110770	NIAID
	RNA	mRNA-1325	NCT03014089	Moderna
I	RNA	mRNA-1893	NCT04064905	Moderna
	DNA	GLS-5700	NCT02809443	GeneOne Life Science Inc./ Inovio Pharmaceuticals
		GLS-5700	NCT02887482	
		VRC5288	NCT02996461	NIAID
		VRC5283	NCT02840487	
	Vectores virales	Ad26.ZIKV.001	NCT03356561	Janssen Vaccine and Prevention B. V
		MV-ZIKA-RSP	NCT04033068	Themis Bioscience GmbH
		MV-ZIKA	NCT02996890	
	Virus atenuado	rZIKV/D4Δ30-713	NCT04015648	Universidad de Oxford
			NCT04440774	
	Virus inactivado	ZPIV	NCT02963909	NIAID/ BIDMC
NCT02952833				
NCT03008122				
NCT02937233				
PIZV/TAK-426		NCT03343626	Takeda Pharmaceutical	
VLA1601		NCT03425149	Valneva Austria GmbH	
BBV121	CTRI/2017/05/008539	Bharat Biotech		

NIAID: Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los EE. UU.; BIDMC: Centro Médico Beth Israel Deaconess

Una de las vacunas más promisorias que se encuentran en fase II es la vacuna VRC5283 (NCT03110770), desarrollada por el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los EE.UU. (NIAID). Ésta se basa en la construcción de un plásmido de DNA que codifica las secuencias virales de la prM-E. Los ensayos preclínicos demostraron que la inmunización en monos *Rhesus* genera anticuerpos neutralizantes contra el virus, además de que en ratones inmunodeprimidos se genera una protección durante el embarazo y contra la transmisión vertical (Pattnaik et al., 2020). Asimismo, se tiene una vacuna basada en RNA mensajero desarrollada por Moderna, mRNA-1325 (NCT03014089), la cual codifica para la proteína prM-E. Los ensayos de fase I demostraron que la inmunización en adultos sanos genera altos niveles de anticuerpos neutralizantes después de la segunda dosis y además no presenta efectos adversos graves (Castanha & Marques, 2020).

II.III Vacunas inactivadas aprobadas para uso comercial y procesos implicados para su desarrollo

Las bases de la inmunización con preparaciones de virus inactivados se establecieron a finales del siglo XIX cuando Pasteur inactivó parcialmente el virus de la rabia. Sin embargo, el desarrollo de vacunas de virus inactivados fue detonada por el uso de cultivos celulares *in vitro* como sistemas de replicación viral, lo que permitió la producción de virus a gran escala (Sanders et al., 2015).

Las vacunas de virus inactivados ofrecen las siguientes ventajas: poseen un perfil de seguridad más alto en comparación que una vacuna viva atenuada (forma debilitada del patógeno manteniéndolo viable), son menos reactogénicas, su aprobación regulatoria es relativamente sencilla, son de fácil producción y son de bajo costo (Pattnaik et al., 2020). No obstante, algunos de los retos en el desarrollo de estas vacunas son: la posible inactivación incompleta del virus; la pérdida de epítomos de neutralización tras la inactivación, lo que puede conllevar a baja eficacia. Además, la inmunogenicidad es baja, por lo tanto, se requieren múltiples dosis y/o el uso de

adyuvantes para lograr una respuesta con altos niveles de anticuerpos neutralizantes (Delrue et al., 2012).

Regularmente, el desarrollo de una vacuna viral inactivada sigue un esquema general que comprende la producción, purificación e inactivación. Anteriormente, la producción viral se realizaba en cultivos primarios, tejidos, huevos fertilizados o incluso organismos completos. Uno de los principales problemas del uso de cultivos primarios es la senescencia, lo cual limita el número de pase a utilizar. Esto ha cambiado con el paso del tiempo y la propagación viral en líneas celulares se ha convertido en una alternativa más promisorio para la industria farmacéutica tanto en términos de costos como en los procesos de producción. También, el número de pase no es una limitante y el uso de tecnología de biorreactores representa una gran ventaja para la propagación a gran escala (Sanders et al., 2015).

La línea celular Vero se convirtió en el primer cultivo celular aprobado por la OMS para la fabricación de vacunas virales para uso humano. Son células epiteliales aisladas del riñón de un mono verde africano *Chlorocebus sabaues* que se han derivado en tres sublíneas: Vero 81, Vero 76 y Vero E6. Es una línea celular continua, puede proliferar a través de muchos ciclos de división sin envejecer, permitiendo así una caracterización celular extensa. Además, se cultivan de forma adherente, pueden crecer en condiciones libres de suero, son consideradas no tumorigénicas y se han utilizado en muchas áreas de investigación como virología, bacteriología, parasitología y toxicología (Kiesslich & Kamen, 2020).

A diferencia de la mayoría de las células de mamíferos, las células Vero son deficientes de interferón α o β y por tanto son susceptibles a una gran variedad de virus. Se ha documentado el uso de esta línea celular para la propagación del Virus del herpes simple, Virus de la varicela zóster, Virus vaccinia, Virus del dengue, Virus de la encefalitis japonesa, Virus de la fiebre amarilla, Virus del Nilo Occidental, Virus del Zika, Virus de la rubeola, Virus de chikungunya, Virus de la influenza, Virus sincitial respiratorio, Virus de la rabia, Virus de la estomatitis vesicular entre otros (Kiesslich & Kamen, 2020). Aunque en la actualidad existen otras líneas celulares (HEK-293,

PER.C6, CAP, AGE1.CR, EB66) para la producción de vectores virales, la línea celular Vero sigue siendo el sustrato de elección para la industria farmacéutica (Kieslich & Kamen, 2020). De hecho, existen vacunas autorizadas derivadas de este tipo celular contra diversos patógenos como rotavirus, poliovirus y algunos flavivirus (Barrett et al., 2009).

La purificación es otro paso que comprende el diseño de vacunas que utilizan virus inactivados. El objetivo principal es eliminar cualquier tipo de contaminante que pudiera interferir en la respuesta inmunológica. Se han descrito algunas técnicas para lograrlo, siendo la ultracentrifugación, cromatografía de exclusión por tamaño y centrifugación en gradiente de sacarosa las más empleadas (Sanders et al., 2015).

El proceso de inactivación comprende agentes reticuladores, procedimientos desnaturalizantes e irradiación. Actualmente, se ha descrito el uso de una gran variedad de agentes o procedimientos de inactivación con fines vacunales. Algunos ejemplos son: formaldehído, glutaraldehído, aldritiol, β -propiolactona, ácido ascórbico, derivados de etilenimina, peróxido de hidrógeno, pH, temperatura, luz ultravioleta, e irradiación gamma. Sin embargo, solo el formaldehído y la β -propiolactona se han convertido en los agentes más promisorios en la inactivación de vacunas virales humanas autorizadas (Delrue et al., 2012).

El formaldehído, o también conocido como formalina cuando es diluido en agua, es el aldehído más simple y se ha utilizado ampliamente como agente reticulador. En una reacción química, al tener un átomo de carbono central deficiente en electrones actúa como electrófilo, por lo tanto, un nucleófilo puede atacar el carbono carbonilo central provocando así una adición nucleofílica (PubChem, 2021). Su efecto provoca una variedad de modificaciones (grupos metilol, bases de Schiff y puentes de metileno) y ejerce su efecto tanto en el genoma como en proteínas. Éstas últimas pueden en consecuencia ser inactivadas, estabilizadas o inmovilizadas (Delrue et al., 2012).

Desde hace unos años, diversos estudios han demostrado que el mecanismo de acción para lograr una inactivación viral completa es un proceso complejo. En

primer lugar, el formaldehído reacciona con los grupos amino y tiol de los aminoácidos y forma así derivados de metilol. Posteriormente, los grupos metilol de los grupos amino primarios al estar parcialmente deshidratados pueden generar bases de Schiff, también llamadas iminas. Finalmente, para lograr una inactivación, estas iminas pueden reticularse con varios residuos de aminoácidos, por ejemplo: glutamina, asparagina, triptófano, histidina, arginina, cisteína y tirosina (Figura 1). No obstante, este tipo de modificaciones no es suficiente para predecir todas las reacciones causadas entre proteína-formalina (Metz et al., 2004).

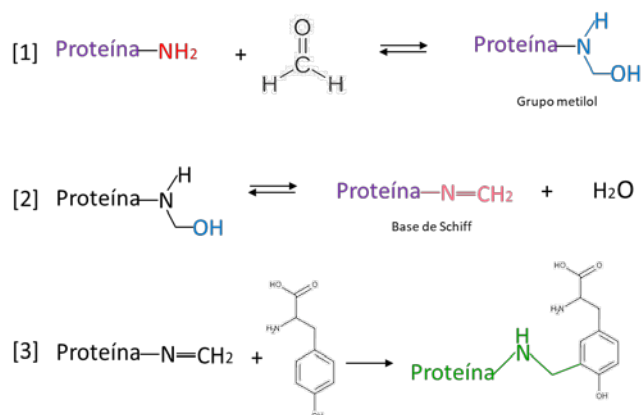


Figura 1.1: El mecanismo de acción comienza con la formación de grupos metilol, el formaldehído reacciona con los grupos amino de las proteínas; 2: los grupos aminos al estar deshidratados generan bases de Schiff; 3: las bases pueden formar enlaces cruzados con varios residuos de aminoácidos (por ejemplo, tirosina) y generar un crosslinking (Modificado de Metz et al., 2004).

Existe una amplia gama de protocolos para realizar una inactivación con formaldehído y esto depende del tipo de patógeno en estudio, teniendo como variables principales la concentración, el tiempo y la temperatura. La primera es muy variada, oscila entre el 0.08% y el 0.009%. Por otra parte, el tiempo de inactivación varía en horas, días o meses, y éste debe de ser suficiente para garantizar una inactivación completa, pero no tan largo como para generar problemas con la inmunogenicidad. Por último, la temperatura ideal debe evitar una degradación térmica, lo cual en general se logra en un rango de 4-37°C (Sanders et al., 2015).

En la actualidad, existe una amplia variedad de vacunas inactivadas autorizadas para su uso en humanos. Algunas de ellas comprenden: Poliovirus, Virus de la hepatitis A, Virus de la encefalitis japonesa, Virus de la encefalitis transmitido por garrapatas, Virus de la influenza y Virus de la rabia (Tabla 2) (FDA, 2021).

Tabla 2. Vacunas inactivadas autorizadas para uso comercial

Agente inactivante	Virus	Nombre	Registro	Compañía
Formaldehído	Poliovirus	VAXELIS	STN 121563	MSP Vaccine Company
		Pentacel IPOL	STN 125145 STN 103930	Sanofi Pasteur
	Hepatitis A	Havrix Twinrix	STN BL103475 STN BL103850	GlaxoSmithKline Biologicals
		VAQTA	STN BL103606	Merck Sharp & Dohme Corp
		Encefalitis japonesa	Ixiario	STN BL125280
	Encefalitis transmitida por garrapatas	Ticovac	STN 125740	Pfizer Ireland Pharmaceuticals
	Influenza	Fluad Quadrivalent	STN 125510	Seqirus Inc.
		Agriflu	STN 125297	
		FluLaval	STN BL125163	ID Biomedical Corporation of Quebec
		Fluzone	STN BL103914	Sanofi Pasteur
Rabia	Imovax	STN 103931	Sanofi Pasteur	
	Rab-Avert	STN BL103334	Novartis Vaccines and Diagnostics	
	Afluria Quadrivalent	STN BL125254	Seqirus Pty Ltd.	
Flucelvax Quadrivalent	STN BL125408			
Fluvirin	STN BL103837			
β -propiolactona	Influenza			

II. IV Clon de cDNA infeccioso del Virus del Zika (ZIKV-ICD)

El reto por combatir la enfermedad de Zika despertó el interés por utilizar herramientas genéticas que permitieran comprender los mecanismos de infección viral y con ello la implementación de estrategias para el desarrollo de vacunas y terapias eficaces. En 2016, el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos generó un clon de cDNA infeccioso (ICD) del virus del Zika (ZIKV-ICD) a partir de la cepa Paraiba_01/2015 en Brasil (GenBank KX280026) (Figura 2). La construcción se basó en la inserción de secuencias de intrones en el marco de lectura abierto de ZIKV. Los resultados demostraron que el ZIKV-ICD es infeccioso, estable, no presenta diversidad mutacional, puede replicarse en diferentes condiciones, se utiliza para la transfección en células HEK 293T y, sobre todo, las células Vero pueden utilizarse para la producción de partículas virales (Tsetsarkin et al., 2016).

El clon ZIKV-ICD se ha aplicado en investigaciones relacionadas a la transmisión y neurocitotoxicidad principalmente. Por una parte, se demostró que ZIKV-ICD se transmite de manera sexual y vertical en ratones $Rag1^{-/-}$ (AIR) y se localiza en áreas focales de células neuroprogenitoras del tejido del Sistema Nervioso Central (Winkler et al., 2017). Asimismo, se evidenció que la placenta y el feto de ratones deficientes en IFN tipo I presenta una mayor susceptibilidad a la infección por ZIKV-ICD en etapas gestacionales tempranas (Jagger et al., 2017). Por otro lado, al realizar la comparación de ZIKV-ICD con un clon aislado de Uganda (MR766), se encontró que la capacidad del virus para unirse, ingresar y replicarse en células gliales SNB-19 del cerebro humano es menor que la cepa africana (Li et al., 2019).

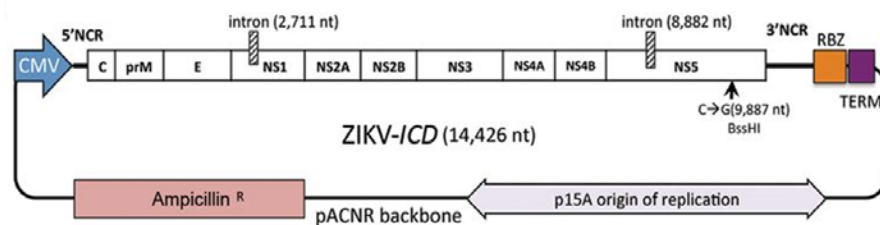


Figura 2. Construcción del plásmido ZIKA-ICD. NCR: región no codificante; RBZ: ribozima antigénica de HDV; TERM: señal poli (A) / terminador RNA polIII (Tomado de Tsetsarkin et al., 2016).

III. JUSTIFICACIÓN

El virus del Zika es un problema de salud pública grave que necesita ser atendido para disminuir la prevalencia e incidencia a nivel mundial. En la actualidad no hay estrategias profilácticas o tratamientos específicos, lo cual representa una meta relevante para la investigación biomédica.

La inmunización vía mucosas no ha sido explorada durante el desarrollo de vacunas contra el Zika. El uso de formulaciones vacunales de Virus del Zika inactivado por la ruta intranasal podría inducir una respuesta humoral neutralizante.

IV. HIPÓTESIS

La producción y purificación del Virus del Zika en células Vero E6 dependerá del tipo de medio de cultivo y será no infeccioso al inactivarlo con formaldehído.

V. OBJETIVO GENERAL

Establecer un método para la producción de Virus del Zika inactivado que permita formular vacunas experimentales.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Propagar el Virus del Zika en la línea celular Vero E6 utilizando medio DMEM y Opti-MEM.
- 2.- Evaluar distintas estrategias para la purificación de ZIKV (centrifugación a baja velocidad, filtros Amicon, y ultracentrifugación).
- 3.- Evaluar distintas condiciones para lograr la inactivación de las partículas virales de Zika empleando diferentes concentraciones de formaldehído.
4. Comprobar la inactivación de ZIKV mediante un ensayo de conteo de placas.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

VII.I Cultivo y medio celular

La línea celular de mono verde africano Vero clona E6 fue donada por el Laboratorio de Células Troncales Humanas de la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y Tecnología (CIACyT)-Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, se utilizó para propagar y cuantificar el virus del Zika.

Las células se crecieron tanto en medio DMEM Gibco™ (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con alto contenido de glucosa, suplementado con 1% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest) y 1% de antibiótico (Ab) penicilina-estreptomicina (Sigma 100X), como en medio Opti-MEM® I 1X (Gibco). Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C, con 95% de humedad y en una atmósfera del 5% de CO₂.

VII.II Virus del Zika generado por transfección mediante ZIKV-ICD

Los stocks virales utilizados para el protocolo de infección fueron generados por transfección en células humanas HEK 293T a partir de un plásmido de cDNA infeccioso (ICD) de ZIKV aislado de la cepa Paraiba Brasil, 2015 (GenBank KX280026) (Tsetsarkin et al., 2016) mediante el método de fosfato de calcio. Los stocks fueron donados por el Laboratorio de Células Troncales Humanas de la CIACyT-Facultad de Medicina UASLP.

VII.III Producción del Virus del Zika empleando medio DMEM y Opti-MEM

Se sembró células Vero E6 en placas de 100 mm (NEST) a una densidad de 3×10^6 células/placa ya sea el caso con DMEM 1 % SFB y 1 % Ab, o con Opti-MEM, 24 h después cada placa fue inoculada con 3 mL de ZIKV-ICD a una multiplicidad de

infección (MOI) aparente de 10 y se incubaron por 2 h con agitación cada 10 min para el proceso de absorción viral.

El inóculo fue retirado, a cada p100 se le colocó 10 mL de DMEM o de Opti-MEM y se dejó incubando por 24 h. A los 1, 2 y 3 días posteriores a la infección (dpi) se realizó observación microscópica para determinar el efecto citopático. El medio fue recuperado por cada dpi y se le adicionó 10 mL del medio correspondiente a cada placa. Se incluyó una placa control sin infección.

VII.IV Métodos de purificación para Virus del Zika

Se emplearon tres métodos diferentes para la purificación. (i) El protocolo de centrifugación a baja velocidad, que consistió en recuperar 50 mL de medio por cada dpi, enseguida se filtró con unidades de PVDF de 0.22 μm (Whatman uniflo) y se guardó a 4°C. Todo el medio recuperado fue centrifugado a 5300 RFC por 15 °C durante 16 h (Rayaprolu et al., 2018).

Por otra parte, se utilizaron filtros Amicon (Merck Millipore) de 100 kDa. De forma similar, 50 mL de medio se recuperaron por cada dpi y se filtró. A cada muestra se le realizó una serie de centrifugaciones a 2000 RFC/ 8 min/ 7°C (ii).

Ultracentrifugación empleando un cojín de sacarosa al 20% (iii). El medio de infección fue recuperado y filtrado por cada dpi. Se colocaron 5 mL de muestra y 500 μL de sacarosa en cada tubo. Después, se ultracentrifugó a 80,000 rpm/ 4 °C durante 2 h y el pellet fue resuspendido en 500 μL de PBS 1X. Todas las muestras se almacenaron a 4 °C.

VII.V Protocolos de inactivación viral empleando formaldehído

Para la inactivación viral se utilizaron dos concentraciones de formaldehído partiendo del stock al 37% (J.T. Baker). En la primera metodología, al virus purificado

se le colocó gota a gota formalina al 0.5% diluida en PBS 1X, consiguiendo una concentración final de formaldehído al 0.05%. Las muestras se incubaron por 49 días a 4°C y se almacenaron posteriormente a 4°C (Fan et al., 2015).

En el segundo protocolo, a cada muestra viral purificada se le adicionó gota a gota formalina al 0.5% diluida en PBS 1X, conduciendo a una concentración final de formalina al 0.02%. El virus se incubó durante 15 días a 22°C (Baldwin et al., 2018). Las muestras se concentraron mediante filtros Amicon y mediante diálisis contra polietilenglicol en polvo y finalmente se dializaron por 48 h con PBS 1X y se almacenaron a 4 °C.

VII.VI Cuantificación de títulos virales mediante ensayo en placa

Se sembraron 400,000 células Vero E6 con DMEM suplementado con 1% SFB y 1% Ab en placas de 6 pozos (Corning™ costar®) y la infección se llevó a cabo a las 24 h de incubación. Primero, a cada placa se le realizó un lavado con DMEM (1 mL/pozo), posteriormente, se preparó una serie de diluciones del stock viral por cada muestra en base 10 (1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y medio control) en un volumen final de 600 μ L. A cada pozo se le colocó gota a gota 450 μ L de inóculo de la dilución correspondiente y se dejó incubar durante 2 h con agitación cada 10 min. Cumplido el tiempo de absorción viral, el inóculo fue retirado y se agregó 3 mL/pozo de carboximetilcelulosa al 1.6%. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 37°C.

Finalmente, las células fueron lavadas con DMEM (3 mL/pozo) y las placas se incubaron por 10 min con agitación cada 2 min tras lo cual el DMEM fue retirado para proceder con la tinción con cristal violeta durante 30 min a temperatura ambiente. Tras un lavado con agua, se procedió a la cuenta de placas y las unidades formadoras de placa (UFP) se calcularon con la siguiente formula:

$$\frac{UFPs}{mL} = \frac{Número\ de\ placas}{(Factor\ de\ dilución)(Volumen\ de\ inóculo\ de\ infección)}$$

VII.VII Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real

Se empleó el kit de extracción QIAamp® Viral RNA (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. En un tubo de 1.5 mL se colocó 140 µL de muestra y 560 µL de buffer AVL-AVE acarreador RNA e inmediatamente se agitó en vórtex por 15 s y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. A cada tubo se le adicionó 560 µL de etanol y se agitó en vórtex por 15 s. El siguiente paso consistió en colocar un tubo colector en una columna, sobre la cual se hicieron pasar en dos ocasiones 630 µL de la muestra previamente inactivada. El flujo de la muestra fue facilitado por centrifugación a 6,000 RFC por 1 min. Posteriormente, la columna fue lavada con 500 µL de buffer AW1 mediante centrifugación a 6,000 RFC por 1 min. Enseguida a la columna se le adicionó 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó a 14,000 RPM por 3 min. La fracción eluída se desechó y se hizo una centrifugación a 20,000 RFC por 1 min. Finalmente, la columna se colocó en un tubo colector de 1.5 mL y se le agregó 40 µL de buffer AVE, y después de incubarlo por 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 6,000 RFC por 1 min para recuperar el RNA. Este paso de elusión se realizó dos veces. Las muestras de RNA obtenidas se almacenaron a -80°C.

La cuantificación absoluta del RNA viral se realizó con el 60 y el equipo Applied 7500 Real-Time PCR System. Se utilizó un volumen de reacción final de 15 µL por muestra conteniendo: 7.5 µL 2X One Step TB Green RT-PCR buffer, 0.6 µL Prime Script I step enzyme mix, 0.06 µL PCR forward and reverse primers, 0.3 µL ROX reference dye II, 2.54 µL NFW y 4 µL de RNA. El protocolo de amplificación comprendió las siguientes etapas: 42°C/ 7 min para la transcripción inversa, 95°C/ 10 s para la desnaturalización inicial, 95°C/ 10 s para la desnaturalización, 60°C/ 1 min; 95°C/ 15 s para el alineamiento y extensión, 35 ciclos y 60°C/ 45 s; 95°C/ 15 s; 4°C/ 10 s para la curva de disociación.

Los oligonucleótidos empleados fueron: Sentido, GAGTGTGATCCAGCCGTTATT; anti-sentido, CAGCCTCCATGTGTCATTCT.

VII.VIII Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas de ZIKV fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE). En un tubo eppendorf se colocó 20 μ L de muestra y 4 μ L de buffer de carga (Azul de bromofenol 1.5 mM, DTT 500 mM, Glicerol 50%, SDS 35mM y Tris 1M, pH 6.8), enseguida, se incubaron por 10 min a 95 °C. Posteriormente, en una celda de electroforesis vertical Mini-Protean (Bio-Rad) las muestras fueron cargadas y se dejaron correr 1:30 h a 140 V. Finalmente, se realizó una tinción con azul de Coomassie.

VII.IX Análisis Dot blot

En una membrana de nitrocelulosa se colocó 10 μ L de cada muestra, enseguida, se lavó con PBS-Tween (3 veces/ 5 min) y se bloqueó con leche en polvo libre de grasa al 5% en PBS 1X durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó con PBS-Tween (3 veces/ 5 min) y se incubó con el anticuerpo monoclonal de ratón 4G2 anti-flavivirus, clon D1-4G2-4-15 (EMD Millipore MAB10216) en dilución 1:1000 durante 48 h a 4°C. Cumplido el tiempo de incubación, la membrana se lavó de nuevo con PBS-Tween (3 veces/ 5 min) y se incubó con el anticuerpo anti-ratón de cabra IRDye® 800CW (LI-COR® 925-32210) en dilución 1:15000 por 2 h a temperatura ambiente. Para finalizar, la membrana se lavó con PBS-Tween (3 veces/ 5 min) y se reveló en el equipo Odyssey CLx (LI-COR) empleando el programa ImageStudio Versión 5.2.

VIII. RESULTADOS

La línea celular Vero E6 presenta efecto citopático al ser infectada con ZIKV con DMEM y Opti-MEM

El desarrollo de sistemas de cultivo para la propagación viral ha representado una herramienta fundamental para los avances en investigación y desarrollo de vacunas contra virus. Uno de los aspectos más relevantes es el uso de células en monocapa para el cultivo de virus *in vitro* de forma relativamente fácil y segura. En este sentido, se utilizaron células Vero E6 para la propagación viral dado que se trata de una línea celular estable y bien caracterizada (Barrett et al., 2009).

Para comprobar que el clon de cDNA de ZIKV generado por transfección era infeccioso, se monitoreó el efecto del inóculo viral en células Vero E6 al dpi-1, dpi-2, dpi-3 y dpi-4. Se observó que el efecto citopático fue muy notorio a partir del dpi-2 tanto en DMEM como en Opti-MEM (Figura 3 y 4). En ambos casos, se observó la capacidad de ZIKV de ocasionar modificaciones en la morfología celular característicos de muerte celular y producir vacuolización citoplásmica en comparación con los controles sin infección (Figura 3 y 4).

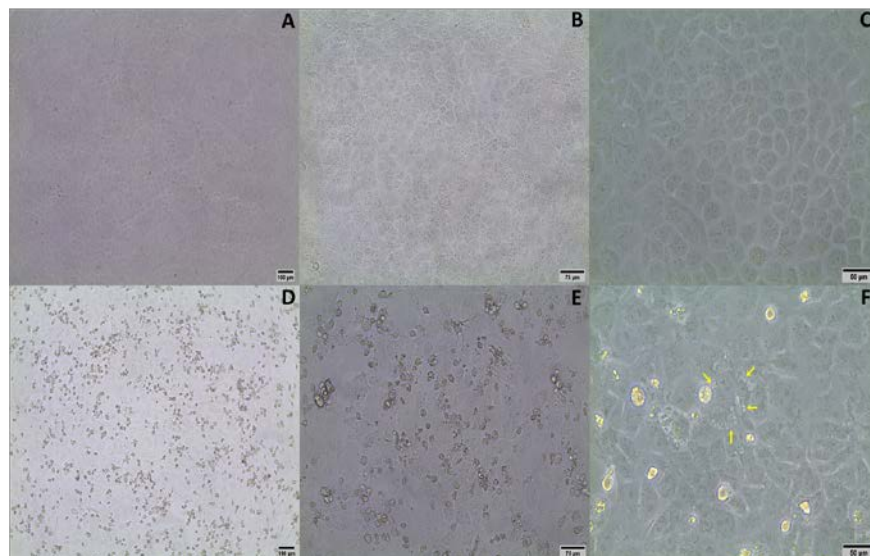


Figura 3. El ZIKV genera efecto citopático en células Vero E6 tratadas con DMEM. A, B y C: control negativo a 10x, 20x y 40x, respectivamente, se observa muerte celular; D, E y F: células infectadas con ZIKV-ICD a 10x, 20x y 40x, respectivamente, se observa muerte celular y vacuolización citoplásmica.

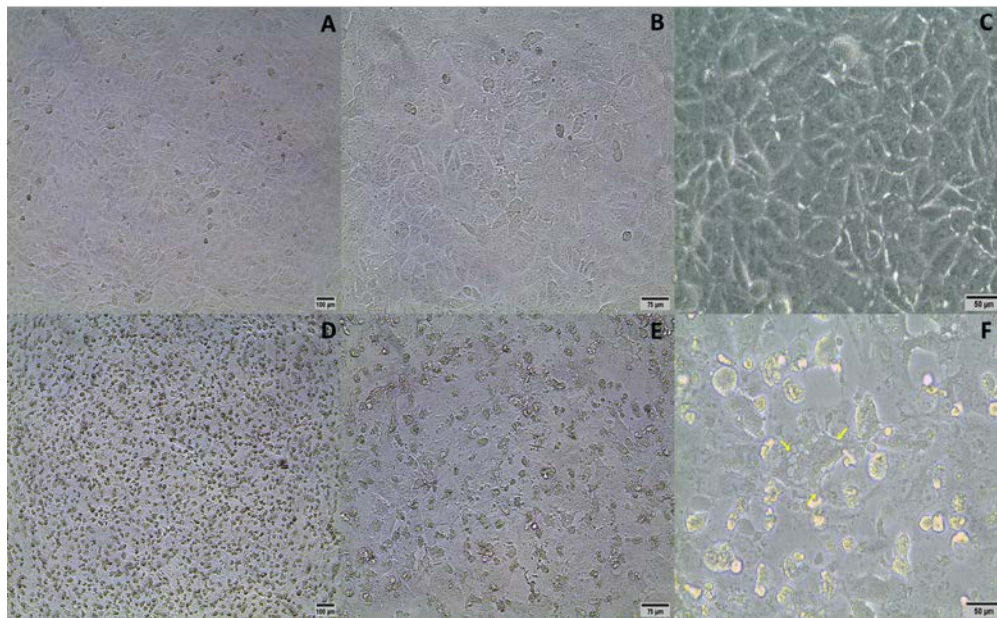


Figura 4. El ZIKV genera efecto citopático en células Vero E6 tratadas con Opti-MEM. A, B, C: control negativo a 10x, 20x y 40x, respectivamente; en los cuales no se observa muerte celular; D, E y F: cultivos sometidos a infección con ZIKV-ICD a 10x, 20x y 40x, respectivamente; se observa muerte celular y vacuolización citoplásmica.

El ensayo en placa permitió determinar los títulos del Virus del Zika producido

Para determinar la cantidad de partículas virales contenidas en la producción se cuantificó los títulos virales mediante ensayo en placa. En todos los ensayos se observó la formación de placas en comparación con los pozos control; asimismo, la forma y el tamaño fueron similares en todos los casos y las placas formadas se logran contar en las diluciones 1×10^{-5} y 1×10^{-6} . Además, se comprobó que 5 días de exposición a carboximetilcelulosa al 1.6% son suficientes para la formación de estas.

En primer lugar, se recuperaron 50 mL de medio de infección DMEM por cada dpi, obteniendo así una producción final en 200 mL. El título viral fue de 9.0×10^8 partículas virales infecciosas (PFU): 6.0×10^6 PFU se obtuvieron al dpi-2 y se observaron 9 placas en la dilución 1×10^{-4} (figura 5A); al dpi-3 y dpi-5 se formaron 3 placas en la dilución 1×10^{-6} y en ambos casos se cuantificaron 2.7×10^8 PFU (Figura

5B y 5D); la producción viral más alta resulto ser al dpi-4 con 3.6×10^8 PFU generándose 4 placas en la dilución más alta (figura 5C).

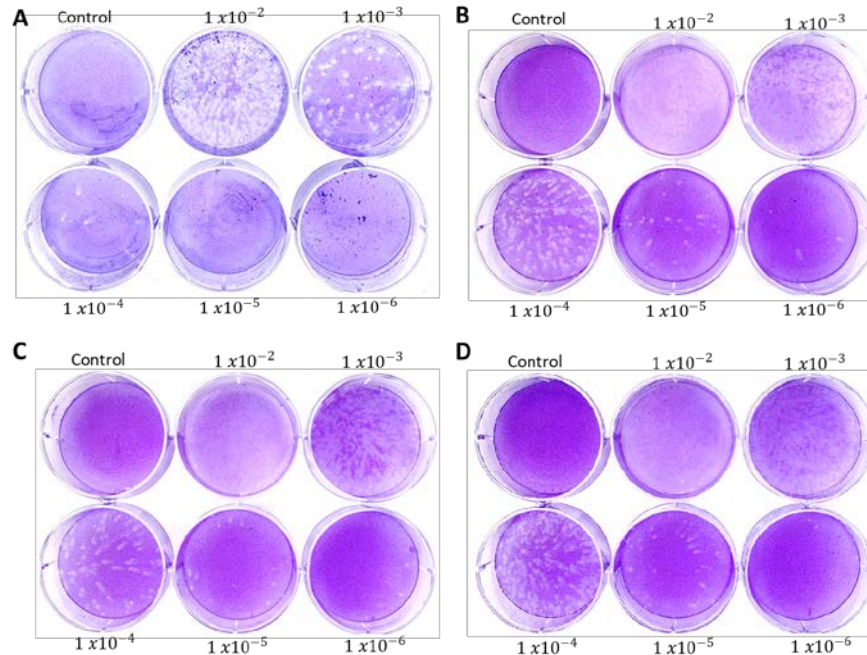


Figura 5. El Virus del Zika producido en células Vero E6 con DMEM genera formación de placas. La producción absoluta de partículas virales infecciosas fue de 9.0×10^8 PFU. A: 6.0×10^6 PFU al dpi-2, B: 2.7×10^8 PFU al dpi-3, C: 3.6×10^8 PFU al dpi-4, y D: 2.7×10^8 PFU al dpi-5.

Por otra parte, la producción viral con Opti-MEM se realizó en 150 mL por duplicado y el medio de infección fue recuperado a los 2 y 3 dpi. De forma similar, las placas formadas se pudieron contabilizar en las diluciones más altas y no se observaron cambios en la morfología de estas. El título viral fue de 6.4×10^8 PFU. En la primera producción se formaron 3 placas al dpi-2 (Figura 6A) y 2 al dpi-3 (Figura 6B) en dilución 1×10^{-6} , obteniendo así 1.0×10^8 y 8.9×10^7 PFU, respectivamente. Para la segunda producción se generaron 3 placas al dpi-2 (Figura 6C) en dilución 1×10^{-6} y 4 placas al dpi-3 (figura 6D) en dilución 1×10^{-5} , produciéndose 4.0×10^8 y 5.3×10^6 PFU, respectivamente.

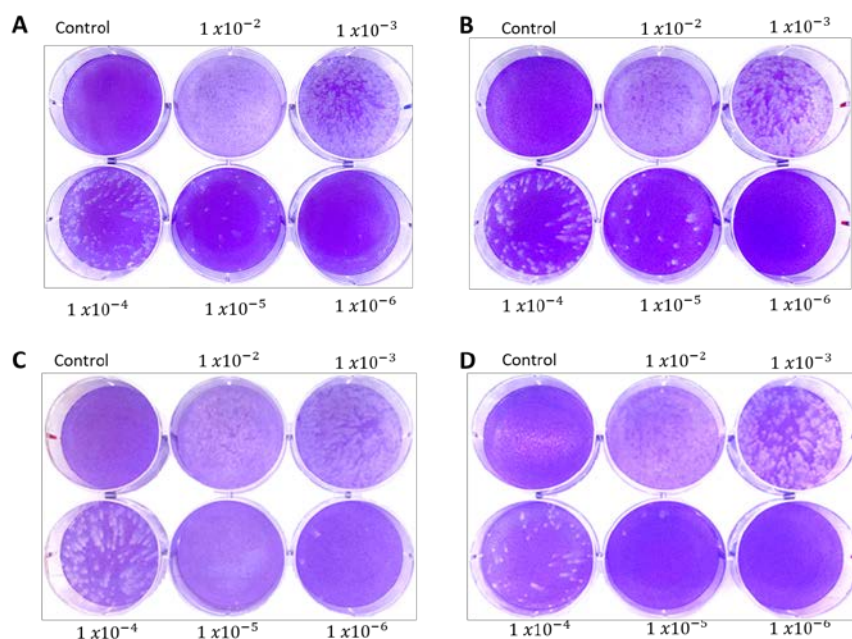


Figura 6. El Virus del Zika producido en células Vero E6 y medio Opti-MEM genera formación de placas. La producción absoluta de partículas virales infecciosas fue de 6.4×10^8 PFU. A: 1.0×10^8 PFU al dpi-2 y B: 8.9×10^7 PFU al dpi-3 (producción uno), y C: 4.0×10^8 PFU al dpi-2 y D: 5.3×10^6 PFU al dpi-3 (producción 2).

Con las cuantificaciones anteriores, se demostró que la producción de partículas virales de Zika fue similar en magnitud al utilizar dos tipos de medios: DMEM y Opti-MEM. Las células Vero E6 al ser tratadas con DMEM exhiben una mayor producción viral en el dpi-4, mientras que con Opti-MEM lo hacen al dpi-2 (Tabla 3 y Figura 7).

Tabla 3. Títulos virales alcanzados durante la producción de ZIKV en DMEM y Opti-MEM

Medio	Producción	PFU				Total PFU
		Dpi-2	Dpi-3	Dpi-4	Dpi-5	
DMEM	1	6.0×10^6	2.7×10^8	3.6×10^8	2.7×10^8	9.0×10^8
Opti-MEM	1	1.0×10^8	8.9×10^7	---	---	6.4×10^8
	2	4.0×10^8	5.3×10^6	---	---	

Nota. La producción total fue en 200 mL de DMEM y 150 mL en Opti-MEM

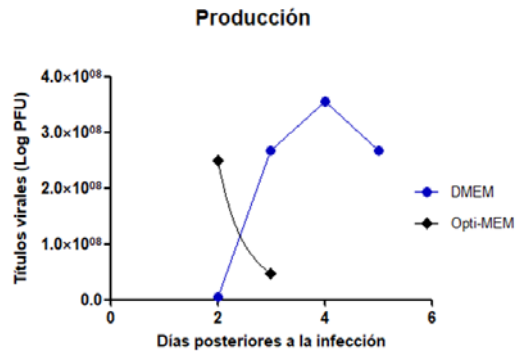


Figura 7. Producción de ZIKV en DMEM y Opti-MEM. Los títulos virales alcanzados demuestran que la producción viral más alta con DMEM ocurre al dpi-4, mientras que con Opti-MEM se presenta al dpi-2.

El método de purificación más apropiado para ZIKV es la ultracentrifugación con cojín de sacarosa al 20%

El objetivo principal del proceso de purificación es la obtención de una muestra con un alto porcentaje de pureza, en tal sentido, se realizaron tres diferentes métodos. En el primer caso, se centrifugó durante 16 h partículas virales producidas en 200 mL con DMEM, como resultado se obtuvo la formación de una pequeña pastilla. Posteriormente, para confirmar la presencia de ZIKV se realizó un gel SDS-PAGE al 10% teniendo como referencia los pesos moleculares de las proteínas estructurales: E de 54 kDa, M de 26 kDa y C de 11 kDa.

Se verificó que las proteínas virales se mantuvieron en el sobrenadante después de 16 h de centrifugación a baja velocidad. La presencia de las proteínas de interés no se observó en la muestra de pastilla, pero sí en el sobrenadante y en la muestra de ZIKV sin centrifugar; en ambos casos, la movilidad electroforética de las moléculas mostró un comportamiento análogo al exhibir bandas entre 60-65 y 85 kDa (Figura 8), aproximadamente. Por todo lo anterior, se concluyó que este método no es el adecuado para la purificación de este arbovirus.

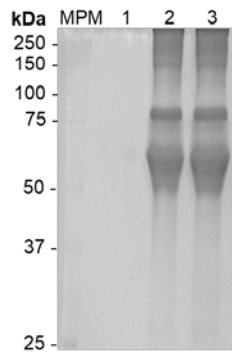


Figura 8. Purificación del ZIKV mediante centrifugación a baja velocidad. Se observa que después de 16 h de centrifugación las partículas virales prevalecen en el sobrenadante. Carril 1: pastilla obtenida, carril 2: sobrenadante y carril 3: muestra de virus sin centrifugar.

Otro de los métodos empleados fue el uso de filtros Amicon de 100 kDa de 50 mL. Se purificaron partículas virales infecciosas generadas en 200 mL con DMEM. Después de realizar varias repeticiones, se confirmó que, aunque se obtienen virus purificados, existe un porcentaje de pérdida por cada centrifugación.

Se realizó un análisis por SDS-PAGE al 10% para determinar la pureza y la presencia de la proteína E. Se observó una banda prominente a los 65-67 kDa que parece corresponder a la proteína E y cuya abundancia corresponde a un 68% respecto a las proteínas totales, mientras que el control sin infección presenta una banda de tamaño similar, pero en una intensidad mucho menor, que parece corresponder a la albúmina del suero empleado en el cultivo (Figura 9).

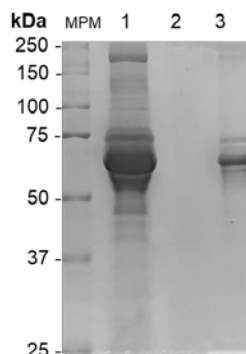


Figura 9. Purificación del ZIKV mediante filtros Amicon. Se observa que el método no presenta una pureza adecuada. Carril 1: virus después de centrifugar, carril 2: DMEM sin suero y carril 3: DMEM sin infección.

Los resultados obtenidos indican que este tipo de método no es el adecuado para Zika, ya que la muestra no exhibió una pureza adecuada y aunque se encontró una banda con un peso de $\approx 65-67$ kDa que probablemente sea la proteína E, las proteínas contaminantes comprenden un 32% de la proteína total.

Finalmente, el último método de purificación realizado fue la ultracentrifugación empelando un cojín de sacarosa al 20%. En este caso, se recuperaron 150 mL de medio de infección Opti-MEM generado en dos producciones independientes. Se realizó un análisis SDS-PAGE al 10% para corroborar la pureza y presencia de la proteína E de ZIKV, observándose que dicha proteína representa un 82% de la proteína total, lo cual indica que este método es adecuado para obtener el virus libre de proteínas celulares presentes en el medio de cultivo (figura 10).

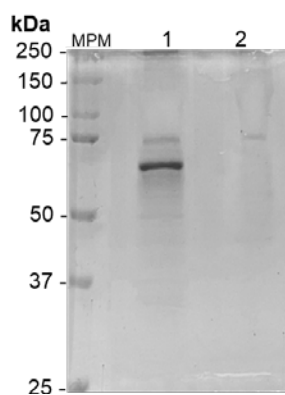


Figura 10. Purificación del ZIKV mediante ultracentrifugación. Se observa que el uso de un cojín de sacarosa al 20% condujo a la obtención de una pureza del 82% en términos de la proteína E. Carril 1: virus ultracentrifugado y carril 2: medio Opti-MEM sin infección.

Con base en estos resultados, se postula al método basado en ultracentrifugación como el más adecuado para generar las formulaciones vacunales de prueba.

El tratamiento con formalina al 0.02% durante 15 días y 22°C inactiva efectivamente a ZIKV

El proceso de inactivación es otro paso fundamental para el desarrollo de las vacunas dadas las implicaciones en la bioseguridad. Con la finalidad de estandarizar

en nuestro laboratorio un método de inactivación de ZIKV, se procedió a explorar distintas condiciones en un tratamiento basado en la inactivación con formaldehído.

Inicialmente, las partículas virales purificadas producidas en DMEM fueron tratadas con formaldehído al 0.05% durante 49 días a 4°C, esto con base a los antecedentes de una vacuna inactivada reportada para el Virus de la encefalitis japonesa (Fan et al., 2015). Posteriormente, se cuantificó el número de copias de ZIKV presentes mediante RT-qPCR, revelando 10^2 y 10^3 copias de genomas/ μ L de Zika, lo que sugiere que este protocolo condujo a una degradación viral.

Posteriormente se realizó un gel SDS-PAGE al 10%, lo que permitió explorar la integridad de las proteínas virales. Se observó que el virus tratado sin formaldehído presentó bandas similares a la muestra recién purificada donde se identificó la proteína E con un peso molecular aproximado entre 65-75 kDa, mientras que el virus expuesto a formalina al 0.05% no mostró presencia de proteínas (Figura 11).

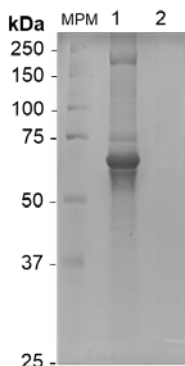


Figura 11. El Virus del Zika sometido a tratamiento con formalina al 0.05%. Se observa que el método provoco a una degradación viral. Carril 1: virus sin formalina y carril 2: virus sometido a formalina.

Ante estos resultados se procedió a explorar otras condiciones para lograr la inactivación de ZIKV y a la vez preservar la integridad de las proteínas virales. Las partículas virales purificadas generadas tanto en DMEM como Opti-MEM se sometieron a un tratamiento basado en 0.02% de formaldehído durante 15 días a 22°C; usando como referencia las condiciones reportadas por Baldwin et al. (2018). Los virus inactivados fueron concentrados y dializados por 48 h.

Por una parte, se utilizaron filtros Amicon de 100 kDa para concentrar el virus generado y por otro lado se ensayó una estrategia de diálisis contra polietilenglicol. Estas estrategias condujeron a una tasa de concentración de 50x y 30x, respectivamente. Posteriormente, el formaldehído fue removido mediante diálisis contra PBS. La suspensión viral obtenida de los lotes DMEM y Opti-MEM se analizó para determinar el número de copias de ZIKV inactivado por medio de RT-qPCR. Las muestras de ambos lotes mostraron curvas con una buena linealidad. El análisis para la muestra del lote DMEM reveló 5.1×10^7 copias de genomas/ μL (valor de CT= 14.6), lo que representa un rendimiento total por lote de 2.2×10^{10} copias de genomas virales. En el caso del lote Opti-MEM, el análisis reveló 1.8×10^6 copias de genomas/ μL (valor de CT=25.4), lo que representa un rendimiento en bruto de 2.0×10^{10} copias de genomas virales por lote.

Se realizó un análisis SDS-PAGE al 10% para evaluar la integridad de las partículas virales. Las muestras tratadas con formalina exhibieron bandas con pesos de ≈ 60 -75 kDa en DMEM y ≈ 67 kDa en Opti-MEM, que probablemente correspondan a la proteína E (Figura 12). Estos resultados permitieron postular el método de inactivación como adecuado para lograr la inactivación de ZIKV preservando la integridad de su genoma.

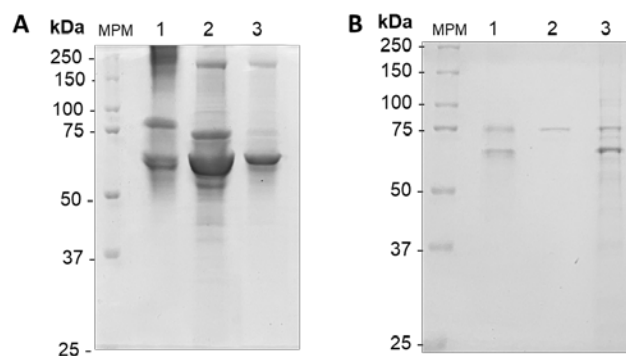


Figura 12. El Virus del Zika sometido a tratamiento con formalina al 0.02%. Se observa que la integridad de las partículas virales se mantiene después de la exposición con formalina en las suspensiones virales obtenidas de DMEM (A) y Opti-MEM (B). Carril 1: virus inactivado, carril 2: medio sin infección y carril 3: virus sometido a formalina.

El método implementado conduce a la inactivación efectiva de ZIKV

Durante el desarrollo de una formulación vacunal es indispensable que el patógeno este completamente inactivado para poder ser administrado en un modelo animal. En este sentido, para demostrar que las partículas virales perdieron su capacidad infectiva se realizó un ensayo en placa.

Se demostró que el tratamiento basado en formaldehído condujo a una inactivación completa de las partículas virales obtenidas de DMEM (figura 13 A) y Opti-MEM (figura 13 B). En ambos casos, no se observó la formación de placas.

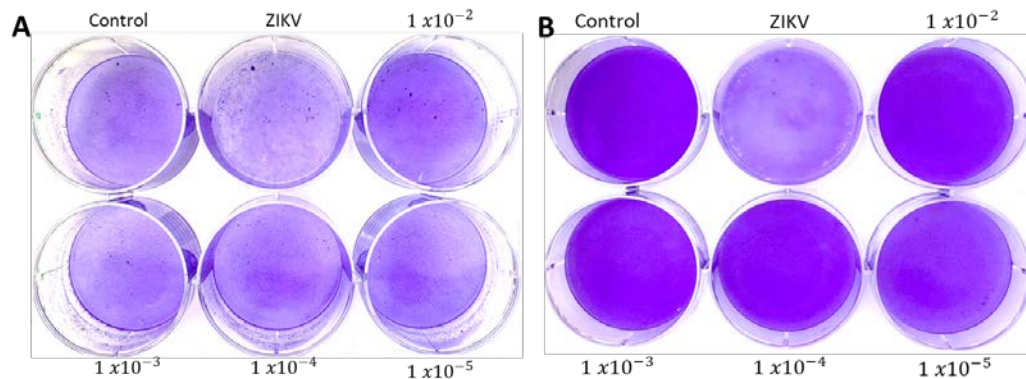


Figura 12. El ZIKV inactivado no genera placas. Se observa que las partículas virales perdieron su capacidad infectiva al ser tratadas con formaldehído en las muestras obtenidas de DMEM (A) y Opti-MEM (B).

Posteriormente, se realizó un análisis dot blot para corroborar la presencia del virus del Zika. Los resultados mostraron una reactividad positiva en todas las suspensiones virales obtenidas en DMEM (Figura 14 A) y Opti-MEM (Figura 14 B), en tanto que, se observó una señal nula para el tratamiento sin infección.

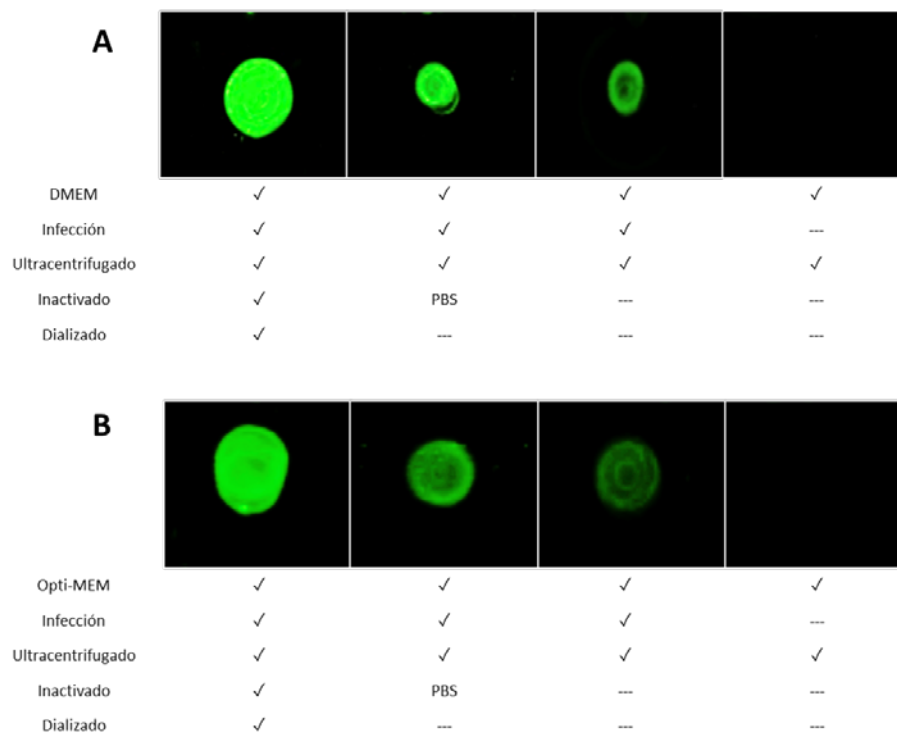


Figura 14. Identificación de la proteína E del ZIKV en virus inactivados mediante dot blot. Se realizó la detección de la proteína E con un anticuerpo específico, sobre membranas de nitrocelulosa sensibilizadas con los virus inactivados. Se observa que la proteína E retiene su antigenicidad en las partículas virales inactivadas obtenidas en DMEM (A) y Opti-MEM (B).

IX. DISCUSIÓN

La rápida diseminación del virus del Zika y su asociación con la microcefalia y el síndrome de Guillain-Barré ha llevado a grupos de investigación de todo el mundo a aunar esfuerzos para encontrar terapias efectivas, así como desarrollar vacunas. En este trabajo se evaluaron diferentes métodos para la inactivación y purificación del virus del Zika, con la meta de formular posteriormente vacunas de mucosas.

Como primer abordaje experimental se produjo el ZIKV en células Vero E6 empleando distintos medios de cultivo (DMEM y Opti-MEM). Se ha demostrado que los flavivirus inducen invaginaciones del retículo endoplásmico (RE) y forman vesículas, las cuales son los supuestos sitios de replicación viral (Cortese et al., 2017). La formación de vesículas citopáticas se observó en los tratamientos con DMEM y

Opti-MEM. Este efecto se presentó de forma similar en células progenitoras neurales humanas infectadas con ZIKV H/PF/2013 (GenBank KJ776791) (Cortese et al., 2017), células Vero E6 infectadas con ZIKV PRVABC59 (GenBank KZ087101) (Rossignol et al., 2017), astrocitos humanos primarios y fibroblastos dérmicos humanos infectadas con ZIKV HD78788 (GenBank KF383039) (Monel et al., 2017). De acuerdo con estos autores, el efecto citopático se relaciona con la formación de vesículas, las cuales se originan y encuentran en el RE, por lo tanto, su acumulación en las células infectadas aumenta los niveles de RNA viral e induce una muerte celular, aunque, también pueden estar asociados otros mecanismos como: apoptosis, necrosis, piroptosis y necroptosis.

Asimismo, se demostró que ZIKA genera partículas virales en DMEM y en Opti-MEM. Estos resultados tienen una similitud con estudios publicados por Shan et al. (2016) y con Tsetsarkin et al. (2016), en donde se evidencia la generación de PFU a partir de los plásmidos de cDNA infecciosos de ZIKV aislados de Camboya en 2010 (GenBank FSS13025) y de Paraiba en 2015 (GenBank KX280026). En ambos casos, la propagación viral se realizó en células Vero con DMEM y la cuantificación de los títulos virales se determinó mediante ensayo en placa. Se reportaron títulos de $1 \times 10^{6-7}$ PFU/mL a los 5, 6 y 7 dpi para el aislado de Camboya y 3.1×10^6 PFU/mL al dpi-3 para el aislado de Paraiba.

Por otra parte, estos resultados demuestran que el medio de cultivo celular influye en el tiempo de recuperación de las partículas virales. Si bien, el DMEM es el medio de mantenimiento y crecimiento de elección para la línea celular Vero E6 (Ammerman et al., 2008), actualmente se ha reportado el uso de medios reducidos o libres de suero como alternativa (Lee et al., 2020). Por lo tanto, cuando las células se mantuvieron con DMEM el medio se recuperó hasta el dpi-5, mientras que, con Opti-MEM ocurrió hasta el dpi-3. Este resultado puede asociarse al uso de SFB, el cual proporciona elementos y factores esenciales para el mantenimiento, crecimiento y proliferación celular (Fang et al., 2017). Además, se ha reportado que la reducción de suero puede reducir la actividad celular basal y afectar las vías de señalización

intercelular (Rashid & Coombs, 2019) y a pesar de que las células pueden ser adaptadas en un medio libre de suero (Kiesslich & Kamen, 2020), es fundamental que su adaptación sea monitorizada por largos periodos de tiempo (van der Valk et al., 2004).

En relación con el proceso de purificación, es importante considerar que aun cuando los virus se purifican mediante técnicas similares, el resultado no siempre es el mismo. Estudios anteriores utilizaron la centrifugación a baja velocidad para la purificación de partículas de alfavirus (Ramsey et al., 2017; Wang et al., 2015). Sin embargo, en base a los resultados obtenidos se demostró que este método no es el adecuado para ZIKV. Además, no se identifican en la literatura reportes sobre el uso de tubos Amicon para la purificación viral de candidatos vacunales, no obstante, este estudio comprobó que la pérdida de muestra es uno de los problemas que se presenta y el porcentaje de retención no es >90% como lo indica el fabricante (Merck, 2021).

La purificación del ZIKV fue exitosa mediante ultracentrifugación empleando un cojín de sacarosa al 20%. Estos resultados se compararon con investigaciones previas, se ha demostrado el uso de ultracentrifugación en colchón de sacarosa al 24% y un gradiente de tartrato de potasio 10-35%/ glicerol 7.5-26% para la purificación de partículas virales de Zika (cepa H/PF/2013, GenBank KJ776791) propagadas en células Vero (Sirohi et al., 2016); y también se ha reportado la purificación de ZIKV-BRPE (GenBank KX197192) propagadas en células C6/36 mediante ultracentrifugación a partir de un gradiente discontinuo de sacarosa del 10-60% (Coelho et al., 2017). En ambos casos, se obtuvieron stocks virales concentrados y libres de la mayoría de los contaminantes celulares.

Por otra parte, la producción de virus en Opti-MEM exhibió una pureza adecuada en comparación con el virus producido en DMEM. Opti-MEM es un medio de suero reducido a base de glutamina, rojo de fenol, insulina, transferrina, hipotánxina, timidina y oligoelementos que compensan el impacto adverso de la suplementación con SFB (Rashid & Coombs, 2019; ThermoFisher, 2021b); en tanto que, DMEM es un medio que contiene aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas,

glucosa, rojo de fenol (ThermoFisher, 2021a) y puede ser suplementado con SFB, el cual contiene proteínas, electrolitos, lípidos, carbohidratos, hormonas, enzimas y otros componentes no definidos que son esenciales para el crecimiento celular (ThermoFisher, 2021c).

Este estudio demostró que el método de purificación y el SFB están relacionados con la pureza de las suspensiones virales obtenidas. Se observó que el método adecuado para la purificación es la ultracentrifugación, sin embargo, la presencia de las bandas contaminantes en ambas muestras probablemente esté relacionado al uso de SFB suplementado en DMEM y al porcentaje de suero presente en Opti-MEM, lo que demuestra que el suero no se eliminó por completo. Estos resultados se compararon con los trabajos de Baldwin et al. (2018) y Sumathy et al. (2017), en los cuales se reportó una pureza >90% mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico, eliminando las impurezas y componentes del medio presentes en la muestra.

Asimismo, se demostró que la concentración, tiempo y temperatura, son factores determinantes para garantizar una inactivación completa. Como lo reporta Sanders y colaboradores (2015), se ha confirmado que en cuanto más alta es la concentración de formaldehído más rápida es la inactivación, por lo tanto, el tiempo debe ser suficiente para obtener una inactivación completa, pero no demasiado largo como para comprometer la estructura/antigenicidad del virus.

El tratamiento basado en formalina al 0.05% durante 49 días, presentó degradación térmica y destrucción de epítomos, de modo que, la metodología empleada para el Virus de la encefalitis japonesa (Fan et al., 2015) no garantiza la inactivación de ZIKV. Asimismo, se demostró que la metodología propuesta por Baldwin et al. (2018) es reproducible y la inactivación de ZIKV es efectiva al utilizar formalina al 0.02% durante 15 días a 22°C. Se identificó la banda correspondiente a la proteína E de ZIKV mediante el análisis SDS-PAGE al 10%. Se observaron bandas a los 65-67 kDa en DMEM y 67 kDa en Opti-MEM, las cuales representaron el 68% y 82% respecto a las proteínas totales, respectivamente.

Investigadores del Reino Unido diseñaron una construcción de la proteína E de ZIKV (Env-CD4), la cual fue expresada en células de mamíferos y purificada por cromatografía en columna de níquel y cromatografía de exclusión por tamaño, mediante tinción de Coomassie y Western blot se identificó a la proteína de envoltura con un peso de $\approx 66-67$ kDa (Kim et al., 2018). De forma similar, el diseño de una proteína ZIKV-E recombinante, fue expresada en *E. coli* y purificada mediante afinidad a metales inmovilizados, comprobando mediante SDS-PAGE la presencia de la proteína E de ZIKV con un peso de ≈ 67.1 kDa (Zhang et al., 2018). Asimismo, la proteína recombinante zEDIII del dominio III de ZIKV se obtuvo de *E. coli* y se usó como inmunógeno. El análisis de los sueros de los ratones inmunizados demostró que la proteína E es inmunogénica y a través del análisis SDS-PAGE y western blot se comprobó que el peso molecular correspondió a ≈ 67 kDa (Cibulski et al., 2021). Estos resultados respaldan el peso molecular observado en el presente estudio para la proteína E (≈ 67 kDa).

Sin embargo, al comparar este resultado con el peso de referencia de 54 kDa (Dey et al., 2021) se demostró que la movilidad de la proteína fue diferente. Esto puede estar relacionado con el sistema de expresión y la glicosilación. Algunos anticuerpos específicos contra la proteína E muestran pesos diferentes dependiendo de su sistema de expresión, por ejemplo, MyBioSource y GenWay utilizan células de insectos y detectan la proteína en ≈ 54 kDa (GenWay, 2021; MyBioSource, 2021), en tanto que, GeneTex identifica a la proteína en ≈ 62 kDa empleando células Vero y BHK-21 (GeneTex, 2021).

Se ha descrito que la glicosilación de proteínas es una de las principales modificaciones que se relaciona con algunos procesos de plegamiento, estabilidad física y actividad enzimática (Hollister et al., 2002). En mamíferos las glicoproteínas ligadas a N-glucanos contienen azúcares ramificados complejos compuestos principalmente por manosa, galactosa, N-acetilglucosamida y ácido neuramínico, mientras que en las células de insecto el oligosacárido es mucho más simple (Kita et al., 2016).

En este contexto, la identificación de la proteína E de ZIKV con un peso de ≈ 67 kDa se relacionó con el sistema de expresión y con la glicosilación, sobre todo, porque en mamíferos se ha reportado que la N-glicosilación puede influir en la estructura final de las proteínas y por tanto en su peso molecular (Harrison & Jarvis, 2006). Además, el entrecruzamiento covalente de la proteína E con el formaldehído también puede estar asociado a la movilidad electroforética (Baldwin et al., 2018).

Finalmente, se demostró la presencia de ZIKV mediante un análisis dot blot. A pesar de que la glicoproteína E está conformada por tres dominios estructurales y funcionales, el dominio II (DII) es el único que contiene los principales epítomos de reacción cruzada y que funciona como un bucle de fusión al tener un puente S-S en su extremo distal (Crill & Chang, 2004), de modo que, el bucle de fusión y otras regiones conservadas son importantes para la especificidad de los anticuerpos y su interacción con las partículas virales (Rey et al., 2018).

Se ha descrito que el anticuerpo primario D1-4G2-4-15 se une al bucle de fusión en el extremo distal del dominio II (EDII) de la proteína E (Haslwanter et al., 2017) y el anticuerpo secundario anti-ratón de cabra (IRDye® 800CW) puede reaccionar con las cadenas pesada y ligera de IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG_a de ratón y con las cadenas ligeras de IgM e IgA de ratón (LI-COR, 2021). Con base a lo anterior y de acuerdo con el resultado, se demostró que el anticuerpo primario a través de la fracción Fab reconoció la proteína E de las suspensiones virales inactivadas obtenidas de DMEM y Opti-MEM. Esto confirmo que el tratamiento con formalina no destruyó los determinantes antigénicos del virus.

X. CONCLUSIONES

Los hallazgos derivados de este estudio muestran que el clon ZIKV-ICD induce una vacuolización citoplásmica masiva en la línea celular Vero E6, convirtiéndolo así, en un sistema eficiente para el desarrollo de vacunas contra ZIKV. Asimismo, el uso de medio de suero reducido Opti-MEM, representa una alternativa muy promisorio para la propagación viral, puesto que, los títulos virales son similares en magnitud al medio con suero.

Se comprobó que el tratamiento con formalina al 0.02% durante 15 días a 22°C inactiva efectivamente al Virus del Zika. Y, a pesar de que se obtuvo una apropiada pureza por ultracentrifugación a través de un cojín de sacarosa al 20%, existen otros métodos que podrían conducir a la optimización de este proceso, por ejemplo, la cromatografía de intercambio iónico.

Finalmente, la movilidad electroforética de la proteína E de ZIKV en ≈ 67 kDa está relacionada con el sistema de expresión, glicosilación y el tratamiento con formalina. En conjunto, nuestro trabajo propone una alternativa de propagación, purificación e inactivación del virus Zika, la cual, permitirá formular vacunas innovadoras contra este patógeno, tales como aquellas administradas por vías mucosales o administradas en conjunto con nanoacarreadores.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alpuche-Lazcano, S. P., McCulloch, C. R., Del Corpo, O., Rance, E., Scarborough, R. J., Moulard, A. J., . . . Gagnol, A. (2018). Higher Cytopathic Effects of a Zika Virus Brazilian Isolate from Bahia Compared to a Canadian-Imported Thai Strain. *Viruses*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/v10020053>
- Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M., & Azad, A. F. (2008). Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr Protoc Microbiol*, Appendix 4, Appendix 4E. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca04es11>
- Baldwin, W. R., Livengood, J. A., Giebler, H. A., Stovall, J. L., Boroughs, K. L., Sonnberg, S., . . . Dean, H. J. (2018). Purified Inactivated Zika Vaccine Candidates Afford Protection against Lethal Challenge in Mice. *Sci Rep*, 8(1), 16509. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34735-7>
- Barrett, P. N., Mundt, W., Kistner, O., & Howard, M. K. (2009). Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 8(5), 607-618. <https://doi.org/10.1586/erv.09.19>
- Beaver, J. T., Lelutiu, N., Habib, R., & Skountzou, I. (2018). Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Front Immunol*, 9, 1640. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01640>
- 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). <https://doi.org/10.3390/v12121371>
- Cibulski, S., Varela, A. P. M., Teixeira, T. F., Cancela, M. P., Sesterheim, P., Souza, D. O., . . . 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 [Original Research]. *Frontiers in Immunology*, 12(515). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.632714>
- Coelho, S. V. A., Neris, R. L. S., Papa, M. P., Schnellrath, L. C., Meuren, L. M., Tschoeke, D. A., . . . de Arruda, L. B. (2017). Development of standard methods for Zika virus propagation, titration, and purification. *J Virol Methods*, 246, 65-74. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.011>
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E. G., Neufeldt, C. J., Oleksiuk, O., Lampe, M., . . . Bartenschlager, R. (2017). Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Rep*, 18(9), 2113-2123. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>
- Crill, W. D., & Chang, G.-J. J. (2004). Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *Journal of virology*, 78(24), 13975-13986. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.24.13975-13986.2004>
- Delrue, I., Verzele, D., Madder, A., & Nauwynck, H. J. (2012). Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert Review of Vaccines*, 11(6), 695-719. <https://doi.org/10.1586/erv.12.38>
- Dey, D., Poudyal, S., Rehman, A., & Hasan, S. S. (2021). Structural and biochemical insights into flavivirus proteins. *Virus Research*, 296, 198343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198343>
- Fan, Y. C., Chiu, H. C., Chen, L. K., Chang, G. J., & Chiou, S. S. (2015). Formalin Inactivation of Japanese Encephalitis Virus Vaccine Alters the Antigenicity and Immunogenicity of a Neutralization Epitope in Envelope Protein Domain III. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(10), e0004167. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004167>
- Fang, C.-Y., Wu, C.-C., Fang, C.-L., Chen, W.-Y., & Chen, C.-L. (2017). Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. *PLOS ONE*, 12(6), e0178960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178960>

- FDA. (2021). *Vaccines Licensed for Use in the United States*. Food & Drug Administration. Retrieved August, 20th from <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/vaccines-licensed-use-united-states>
- GeneTex. (2021). *Zika virus Envelope protein*. Retrieved November 18th from <https://www.genetex.com/Product/Detail/Zika-virus-Envelope-protein-antibody/GTX133314#datasheet>
- GenWay. (2021). *Recombinant Zika Virus Envelope Protein (GWB-MA0628)*. Retrieved November 18th from <https://www.genwaybio.com/zika-virus-envelope-protein-gwb-ma0628>
- Harrison, R. L., & Jarvis, D. L. (2006). Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res*, 68, 159-191. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(06\)68005-6](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(06)68005-6)
- Haslwanter, D., Blaas, D., Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2017). A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection. *PLoS pathogens*, 13(9), e1006643-e1006643. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006643>
- Hollister, J., Grabenhorst, E., Nimtz, M., Conradt, H., & Jarvis, D. L. (2002). Engineering the Protein N-Glycosylation Pathway in Insect Cells for Production of Biantennary, Complex N-Glycans. *Biochemistry*, 41(50), 15093-15104. <https://doi.org/10.1021/bi026455d>
- Jagger, B. W., Miner, J. J., Cao, B., Arora, N., Smith, A. M., Kovacs, A., . . . Diamond, M. S. (2017). Gestational Stage and IFN- λ Signaling Regulate ZIKV Infection In Utero. *Cell host & microbe*, 22(3), 366-376.e363. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.08.012>
- 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/https://doi.org/10.1002/jobm.201700398>
- Kiesslich, S., & Kamen, A. A. (2020). Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnol Adv*, 44, 107608. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107608>
- Kim, Y. C., Lopez-Camacho, C., Nettleship, J. E., Rahman, N., Hill, M. L., Silva-Reyes, L., . . . Reyes-Sandoval, A. (2018). Optimization of Zika virus envelope protein production for ELISA and correlation of antibody titers with virus neutralization in Mexican patients from an arbovirus endemic region. *Virology Journal*, 15(1), 193. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1104-6>
- Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. S., & Dye, C. (2016). Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ*, 94(9), 675-686c. <https://doi.org/10.2471/blt.16.171082>
- Kita, S., Maenaka, K., & Tadokoro, T. (2016). Expression of proteins in insect and mammalian cells. In *Advanced Methods in Structural Biology* (pp. 25-45). Springer.
- Lee, D. K., Park, J., & Seo, D. W. (2020). Suspension culture of Vero cells for the production of adenovirus type 5. *Clin Exp Vaccine Res*, 9(1), 48-55. <https://doi.org/10.7774/cevr.2020.9.1.48>
- Li, G., Bos, S., Tsetsarkin, K. A., Pletnev, A. G., Desprès, P., Gadea, G., & Zhao, R. Y. (2019). The Roles of prM-E Proteins in Historical and Epidemic Zika Virus-mediated Infection and Neurocytotoxicity. *Viruses*, 11(2), 157. <https://doi.org/10.3390/v11020157>
- LI-COR. (2021). *IRDye® 800CW Anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra*. Retrieved November 22th from <https://www.licor.com/bio/reagents/irdye-800cw-goat-anti-mouse-igg-secondary-antibody>
- Merck. (2021). *Amicon® Pro Purification System*. Retrieved November 10th from https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Amicon-Pro-Purification-System,MM_NF-C126978

- Metz, B., Kersten, G. F. A., Hoogerhout, P., Brugghe, H. F., Timmermans, H. A. M., de Jong, A., . . . Jiskoot, W. (2004). Identification of Formaldehyde-induced Modifications in Proteins: REACTIONS WITH MODEL PEPTIDES*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6235-6243. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M310752200>
- Miquel-Clopés, A., Bentley, E. G., Stewart, J. P., & Carding, S. R. (2019). Mucosal vaccines and technology. *Clinical & Experimental Immunology*, 196(2), 205-214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cei.13285>
- Monel, B., Compton, A. A., Bruel, T., Amraoui, S., Burlaud-Gaillard, J., Roy, N., . . . Schwartz, O. (2017). Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *Embo j*, 36(12), 1653-1668. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695597>
- MyBioSource. (2021). *Zika virus envelope Recombinant Protein*. Retrieved November 18th from <https://www.mybiosource.com/recombinant-protein/zika-virus-envelope/5304720>
- Nazerai, L., Pravsgaard Christensen, J., & Randrup Thomsen, A. (2019). A 'Furry-Tale' of Zika Virus Infection: What Have We Learned from Animal Models? *Viruses*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/v11010029>
- Pattnaik, A., Sahoo, B. R., & Pattnaik, A. K. (2020). Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. *Vaccines (Basel)*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/vaccines8020266>
- Poland, G. A., Kennedy, R. B., Ovsyannikova, I. G., Palacios, R., Ho, P. L., & Kalil, J. (2018). Development of vaccines against Zika virus. *Lancet Infect Dis*, 18(7), e211-e219. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30063-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30063-x)
- PubChem. (2021). *Formaldehyde*. Retrieved August 23 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Formaldehyde>
- Ramsey, J., Renzi, E. C., Arnold, R. J., Trinidad, J. C., & Mukhopadhyay, S. (2017). Palmitoylation of Sindbis Virus TF Protein Regulates Its Plasma Membrane Localization and Subsequent Incorporation into Virions. *Journal of virology*, 91(3), e02000-02016. <https://doi.org/10.1128/JVI.02000-16>
- Rashid, M.-U., & Coombs, K. M. (2019). Serum-reduced media impacts on cell viability and protein expression in human lung epithelial cells. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 7718-7724. <https://doi.org/10.1002/jcp.27890>
- Rayaprolu, V., Ramsey, J., Wang, J. C.-Y., & Mukhopadhyay, S. (2018). Alphavirus Purification Using Low-speed Spin Centrifugation. *Bio-protocol*, 8(6), e2772-e2772. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2772>
- Rey, F. A., Stiasny, K., Vaney, M.-C., Dellarole, M., & Heinz, F. X. (2018). The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design [<https://doi.org/10.15252/embr.201745302>]. *EMBO reports*, 19(2), 206-224. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/embr.201745302>
- Rosales-Mendoza, S., & González-Ortega, O. (2019). *Nanovaccines. An Innovative Technology to Fight Human and Animal Diseases*. Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-31668-6_3
- Rosignol, E. D., Peters, K. N., Connor, J. H., & Bullitt, E. (2017). Zika virus induced cellular remodelling. *Cell Microbiol*, 19(8). <https://doi.org/10.1111/cmi.12740>
- Salud, S. d. (2021). *Casos confirmados autóctonos de enfermedad por virus del Zika por entidad federativa. Semana epidemiológica* 29,2021. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/659112/CuadroCasosZikayEmb_SE29_2021.pdf
- Sanders, B., Koldijk, M., & Schuitemaker, H. (2015). Inactivated Viral Vaccines. In B. K. Nunnally, V. E. Turula, & R. D. Sitrin (Eds.), *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control* (pp. 45-80). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45024-6_2

- Shan, C., Xie, X., Muruato, A. E., Rossi, S. L., Roundy, C. M., Azar, S. R., . . . Shi, P. Y. (2016). An Infectious cDNA Clone of Zika Virus to Study Viral Virulence, Mosquito Transmission, and Antiviral Inhibitors. *Cell Host Microbe*, 19(6), 891-900. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.004>
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6284), 467-470. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5316>
- Stott, D. I. (1989). Immunoblotting and dot blotting. *Journal of immunological methods*, 119(2), 153-187. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90394-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90394-3)
- Sumathy, K., Kulkarni, B., Gondu, R. K., Ponnuru, S. K., Bonguram, N., Eligeti, R., . . . Ella, K. M. (2017). Protective efficacy of Zika vaccine in AG129 mouse model. *Scientific Reports*, 7(1), 46375. <https://doi.org/10.1038/srep46375>
- ThermoFisher. (2021a). *DMEM, powder, high glucose*. Retrieved November 18th from <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/technical-resources/media-formulation.186.html>
- ThermoFisher. (2021b). *Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium*. Retrieved November 18th from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/31985054?SID=srch-srp-31985054>
- ThermoFisher. (2021c). *Suero fetal bovino, Premium Plus*. Retrieved November 18 th from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A4766801?SID=srch-srp-A4766801>
- Tsetsarkin, K. A., Kenney, H., Chen, R., Liu, G., Manukyan, H., Whitehead, S. S., . . . Palese, P. (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), e01114-01116. <https://doi.org/doi:10.1128/mBio.01114-16>
- van der Valk, J., Mellor, D., Brands, R., Fischer, R., Gruber, F., Gstraunthaler, G., . . . Baumans, V. (2004). The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro*, 18(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.08.009>
- Wang, J. C.-Y., Chen, C., Rayaprolu, V., Mukhopadhyay, S., & Zlotnick, A. (2015). Self-Assembly of an Alphavirus Core-like Particle Is Distinguished by Strong Intersubunit Association Energy and Structural Defects. *ACS nano*, 9(9), 8898-8906. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b02632>
- WHO. (2020). *Vaccine Pipeline Tracker: Zika*. Retrieved from <https://docs.google.com/spreadsheets/d/19otvINcayJURCMg76xWO4KvuyedYbMZDcXqbyJGdcZM/pubhtml#>
- WHO. (2021). *Zika virus*. Retrieved September 8th from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
- 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), 7176-7176. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07099-7>
- Zhang, L., Chen, C., Dai, L., Zhang, L., Xu, K., Song, Y., . . . Zhang, J. (2018). Efficient Capture and Detection of Zika Virus by Polyclonal Antibody Against Prokaryotic Recombinant Envelope Protein. *Jundishapur Journal of Microbiology*, In Press. <https://doi.org/10.5812/jjm.68858>