



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CLONACION, EXPRESION Y PURIFICACIÓN DEL  
INTERFERON GAMMA RECOMBINANTE DE OVINO Y  
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIVIRAL**

**TESIS PRESENTADA ANTE LA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DE LA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA  
POR**

**MONTSERRAT ARROYO KURIBREÑA**



**ASESOR: DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES**

**MÉXICO, D.F.**

**2004**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

El presente trabajo de investigación fue realizado durante la estancia de Práctica Profesional Supervisada en la Universidad de Texas A&M en el laboratorio de Patobiología del Dr. Andrés de la Concha con la colaboración del Ing. Alberto Morales PhD. La información obtenida pertenece a la línea de investigación del Dr. de la Concha.

## DEDICATORIA

A mi papá, mi mejor amigo y maestro por enseñarme mi mundo, la veterinaria.

A mis abuelitos por llevarme de la mano.

A mi Mamá, Nacho, Nanis y Carmen por todo su apoyo, al Choco por tu ejemplo, a la Güera por tu consejo y al Gonzo por las largas noches de ayuda, compañía y por ser mi hermano en todo el sentido de la palabra.

A Nikis, Koshka, Petus, Baguis y el RSM.

### **A G R A D E C I M I E N T O S**

Al Dr. de la Concha por el gran apoyo que me dio para realizar esta tesis  
y por todo lo aprendido en su laboratorio.

To Jianhua Guo (Super Joe) for being my mentor, teacher and friend.

Al Ing. Alberto Morales PhD porque sin su gran ayuda, enseñanzas y  
amistad no hubiera podido desarrollar el presente trabajo.

A mi facultad y en especial a mis maestros por darme la oportunidad y  
el apoyo para lograr mi sueño de ser una Veterinaria Zootecnista.

## CONTENIDO

Página

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN.....   | 1  |
| INTRODUCCIÓN.....  | 2  |
| HIPÓTESIS.....   | 7  |
| OBJETIVO GENERAL.....  | 7  |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 7  |
| MATERIAL Y MÉTODOS   |    |
| 2.1 Construcción del vector de expresión y transformación de <i>E. coli</i>    | 8  |
| 2.2 Verificación del inserto en el plásmido.....                               | 9  |
| 2.3 Expresión del gen <i>oIFN-γ</i> en la cepa BL21DE3 de <i>E. coli</i> ..... | 10 |
| 2.4 SDS-PAGE y <i>Western blot</i> .....                                       | 11 |
| 2.5 Purificación de la proteína.....   | 12 |
| 2.6 Prueba de actividad antiviral del IFN-γ.....                               | 12 |
| RESULTADOS   |    |
| 3.1 Construcción del vector de expresión y transformación de <i>E. coli</i>    | 14 |
| 3.2 Verificación del inserto en el plásmido.....                               | 14 |
| 3.3 SDS-PAGE y <i>Western blot</i> .....                                       | 14 |
| 3.4 Purificación de la proteína .....  | 15 |
| 3.5 Prueba de actividad antiviral del IFN-γ.....                               | 15 |
| DISCUSIÓN.....   | 16 |
| CONCLUSIONES.....  | 19 |
| PERSPECTIVAS.....  | 19 |
| FIGURAS.....   | 20 |
| CUADROS.....   | 24 |
| CUADRO DE ABREVIATURAS.....  | 26 |
| LITERATURA CITADA.....   | 27 |

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Página

FIGURA (1)

**Proteínas inducidas por los interferones..... 20**

FIGURA (2)

**Electroforesis De Las Digestiones Enzimáticas De pGEX-4T-γ..... 21**

FIGURA (3)

**Árbol De Las Relaciones Filogenéticas Del Gen del IFN en Diferentes  
Especies De Rumiantes..... 22**

FIGURA (4)

**SDS-PAGE De Proteínas Totales y Eluciones..... 23**

CUADRO (1)

**Comparación De Secuencias De Aminoácidos Mediante El Programa  
Computacional MegAlign 4.03 DNASTAR, Inc..... 24**

CUADRO (2)

**Valores De Similitud De Las Secuencias del Gen del IFN-γ en diferentes  
especies de rumiantes..... 25**

**RESUMEN**

ARROYO KURIBREÑA, MONTSERRAT. Clonación, Expresión y Purificación del Interferón Gamma Recombinante de Ovino y Evaluación de su Actividad Antiviral(bajo la dirección de: Dr. Francisco Suárez Güemes)

Los interferones (IFNs) son una familia de proteínas que pueden clasificarse como citocinas, las cuales son importantes en la defensa del organismo. Una de sus funciones más importantes es que interfieren en la replicación de los virus, propiedad de donde se origina el nombre de interferón. El IFN- $\gamma$  o tipo II es inducido por una estimulación mitogénica o antigénica de los linfocitos T y células NK. El IFN- $\gamma$  induce una gran variedad de respuestas que contribuyen a la inmunidad, y una de sus actividades clave son aquellas que afectan la respuesta innata a patógenos virales. Gracias a las técnicas de biología molecular se puede manipular, a nivel de gen la producción de una proteína nativa en la forma de proteína recombinante. La proteína recombinante se expresa como proteína fusionada a un fragmento peptídico que permite su purificación en columnas de afinidad. En este trabajo, se logró la producción de IFN- $\gamma$  recombinante en la cepa de *E.coli* BL21, se utilizó como vector de expresión el plásmido pGEX-4T. El cual fue inducido con IPTG para expresar la proteína recombinante roIFN- $\gamma$ . El producto de expresión a su vez fue evaluado para conocer su actividad antiviral contra el virus de la estomatitis vesicular en células vero. La disponibilidad de este interferón producido en *E. coli* recombinante, podría facilitar su evaluación y aplicación, como tratamiento y medida de control contra enfermedades virales y por bacterias intracelulares del ganado en un futuro.

## INTRODUCCIÓN

Los interferones (IFNs) son una familia de proteínas que pueden clasificarse como citocinas. Estos fueron descubiertos por su potente actividad antiviral, la cual interfiere en la replicación de los virus, propiedad de donde se origina el nombre de interferón<sup>1</sup>.

Los IFNs tienen diversas funciones y forman parte de las defensas del huésped contra infecciones virales, parasitarias y algunos tumores<sup>2</sup>, así como en la respuesta inmune a infecciones bacterianas intracelulares<sup>3</sup>. Afectan la función del sistema inmune de diversas formas, así como la proliferación y diferenciación celular. Las múltiples actividades de los interferones son principalmente a través de la inducción de la síntesis de proteínas<sup>1,2,3</sup>, al fijarse a receptores específicos en la membrana celular. Además de su acción antiviral directa, estimulan la diferenciación de células Th1 y la respuesta inmune citotóxica, la actividad de las células naturalmente asesinas (NK) y la actividad antimicrobiana de macrófagos y neutrófilos. Todas estas moléculas tienen el potencial de modular la resistencia a enfermedades así como también modulan el grado de la respuesta inmune a una gran variedad de enfermedades infecciosas y vacunas<sup>4</sup>.

Los IFNs se pueden integrar en dos grupos, los interferones tipo I y tipo II. Los tipo I son inducidos por infecciones virales e incluyen al IFN- $\alpha$  (leucocito,  $\alpha 1$ ), IFN- $\beta$  (fibroblasto), IFN- $\omega$  (trofoblasto)<sup>1</sup> y dos subtipos recientemente clasificados: el IFN- $\tau$  (trofoblasto)<sup>5</sup> e IFN- $\kappa$  (queratinocitos) en el humano<sup>43</sup>.

El IFN tipo II es inducido por estimulación mitogénica o antigénica de los linfocitos T y células NK, y está representado únicamente por el IFN-

$\gamma^{1,2,3,4}$  también conocido como IFN tipo II o IFN inmune<sup>1</sup>. Este interferón, es un mediador importante del choque citotóxico<sup>6</sup>.

A diferencia del gran número de genes y proteínas que codifican para los interferones tipo I, en el humano y el ratón, sólo existe un gen que codifica el IFN- $\gamma$ . El gen del IFN- $\gamma$  se encuentra en el brazo largo del cromosoma 12 del humano, en el cromosoma 10 del ratón y en el 3 del borrego<sup>7</sup>. El gen del IFN- $\gamma$  posee cuatro exones y tres intrones, a diferencia de aquellos para los IFNs tipo I que carecen de intrones<sup>3</sup>.

Las células NK, los linfocitos CD4 Th1 y CD8 citotóxicos producen IFN- $\gamma$ . La interleucina (IL)12 producida por macrófagos, células dendríticas y células B<sup>3,43</sup>, y la IL-18 también conocida como IGIF por sus siglas en inglés (*interferon gamma inducing factor*) producida por monocitos sanguíneos activados y macrófagos tisulares. Ambas interleucinas son citocinas que inducen la producción de IFN- $\gamma^{3,44}$ .

El IFN- $\gamma$  induce una gran variedad de respuestas que contribuyen a la inmunidad, coordina su actividad a través de un receptor celular conocido como IFNGR1 e IFNGR2<sup>45</sup>, que son generalmente específico de especie. Entre las actividades claves del IFN- $\gamma$  están aquellas que afectan la respuesta inmune a patógenos intracelulares<sup>3</sup>.

El mecanismo de acción de los interferones contra patógenos microbianos está mediado a través de la inducción de varias proteínas celulares. Existen más de 100 proteínas inducidas por los interferones que participan en la respuesta inmune del huésped a patógenos microbianos y virales<sup>3</sup>.

La inducción de enzimas prepara a la célula a resistir virus infectantes; se considera que los interferones actúan en las células para cambiar su bioquímica de modo tal que la replicación del virus deja de ser posible, o al menos, se reduce de manera significativa<sup>8</sup>.

Dentro de las proteínas inducidas más importantes se pueden mencionar:

- a) **PKR-cinasa:** ésta se activa con el RNA, e inhibe la traducción de células animales a través de la fosforilación del factor de iniciación eIF-2 $\alpha$  de la síntesis de proteínas en células eucariotas.
- b) **Familia de la 2'-5' oligoadenilato sintetasa:** también se activan con el RNA y median la degradación de RNA a través de la activación de la 2,5<sup>a</sup> RNasa L.
- c) **Adenosín-deaminasas:** las cuales catalizan la edición de adenosina a inosina del RNA.<sup>3,41</sup>
- d) **Proteínas de la familia MX:** son GTPasas que afectan el transporte intracelular de partículas virales.
- e) **Otras proteínas:** factores de traducción IRF-1, IRF-9, ICSB y CIITA.
- f) **Expresión inducible de proteínas del complejo de histocompatibilidad mayor tipo II (MHCII) por el IFN- $\gamma$ :** los cuales contribuyen a las actividades del IFN contra patógenos bacterianos y virales a través de la intensificación de la respuesta de células T específicas a patógenos<sup>3</sup>. (ver Fig 1)

Existen varios informes donde se reconoce el papel del IFN- $\gamma$  en enfermedades que afectan a rumiantes. Por ejemplo, en la restricción de la multiplicación de *Chlamydomphila abortus* que causa aborto enzótico en ovejas y cabras<sup>9</sup>. También se ha observado que los ratones con mutaciones sobre el gen del IFN- $\gamma$  o su receptor, muestran una disminución en la respuesta inmune contra infecciones microbianas por patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*<sup>10,45,46</sup>, *Salmonella typhimurium*<sup>11</sup>, *Leishmania major*<sup>12</sup> y *Listeria monocytogenes*<sup>13</sup>.

Como herramienta diagnóstica, el IFN- $\gamma$  se ha utilizado de manera comercial para el diagnóstico de tuberculosis en bovinos y en investigaciones previas, ha mostrado ser más sensible que la prueba intradérmica cervical<sup>14,46</sup>. También se ha investigado su uso para el diagnóstico de paratuberculosis concluyendo que es un método diagnóstico apropiado para estas enfermedades en ganado joven<sup>15</sup>.

El uso de los interferones como terapéuticos puede seguir tres diferentes estrategias:

- a) La inducción de interferón endógeno por un agente viral avirulento.
- b) La inducción de interferón endógeno con compuestos químicos no tóxicos.
- c) La aplicación local o sistémica de interferón de una fuente exógena.

El uso de IFN exógeno puede ser una estrategia interesante para el tratamiento de animales. Cuando los animales crecen bajo condiciones de alto hacinamiento están sujetos a mayor estrés ambiental por agentes infecciosos, haciéndolos más susceptibles a patógenos oportunistas. El interferón- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  de bovino ya se utiliza terapéuticamente contra el complejo respiratorio bovino en el ganado<sup>8</sup>.

Otra aplicación importante de las citocinas como el IFN- $\gamma$  será su uso como adyuvantes naturales para vacunas, particularmente para vacunas de subunidades producidas por tecnología de DNA recombinante como es el caso de la vacuna de subunidades contra la tuberculosis que está en desarrollo<sup>16</sup>. Wood y colaboradores mencionan que el uso de citocinas recombinantes como adyuvantes ofrecen una buena oportunidad para manipular las fórmulas de vacunas para inducir la producción de citocinas apropiadas que promuevan el desarrollo de una inmunidad protectora; como

por ejemplo, el tratamiento con IFN- $\gamma$  en la inmunización primaria resultó en una mayor respuesta de anticuerpos secundarios a la proteína de la estomatitis vesicular en bovinos<sup>17</sup>.

Actualmente, gracias a las técnicas de biología molecular se puede manipular, a nivel de gen la producción de una proteína nativa en la forma de proteína recombinante. La proteína recombinante se expresa como proteína fusionada a un fragmento peptídico que permite su purificación en columnas de afinidad<sup>18</sup>. Con esta tecnología se ha logrado la producción de IFN- $\gamma$  recombinante en bacterias y levaduras. Se ha reportado la clonación de los genes que codifican para los IFN- $\gamma$  del ratón<sup>19</sup>, rata algodón<sup>20</sup>, venado<sup>21</sup>, bovino<sup>22</sup>, humano<sup>23</sup>, caprino<sup>24</sup> y ovino<sup>3,25</sup>. La disponibilidad de estas proteínas permite el análisis de su función inmune y el papel que juega en el control de la respuesta inmune en enfermedades y vacunaciones<sup>3</sup>.

La disponibilidad de interferones recombinantes producidos en *E. coli*, podría asegurar su evaluación y aplicación, como medida de control contra enfermedades virales del ganado en un futuro<sup>8</sup>. Sin embargo, el IFN- $\gamma$  recombinante de ovino no está disponible en Norteamérica<sup>26</sup>.

Por lo anterior, se planteó clonar, expresar, purificar el producto del gen del IFN- $\gamma$  de ovino y evaluar su actividad antiviral, con fin de, en un futuro encontrar aplicación en la producción intensiva de ganado ovino, así como en el diagnóstico de algunas enfermedades que los afectan.

**Hipótesis**

- El IFN- $\gamma$  ovino recombinante producido en sistema *E. coli* presenta actividad antiviral.

**Objetivo general**

- Clonar, expresar y purificar el IFN- $\gamma$  recombinante de ovino mediante técnicas biotecnológicas para evaluar su actividad antiviral.

**Objetivos específicos**

- Clonar el gen que codifica el IFN- $\gamma$  ovino en *E. coli* usando el plásmido pGEX-4.
- Expresar y purificar el producto del gen que codifica para el interferón gamma ovino usando la proteína de fusión glutathion S transferasa.
- Evaluar la actividad antiviral del IFN- $\gamma$  ovino utilizando el virus de la estomatitis vesicular en células Vero.

## 2. MATERIAL Y METODOS

### 2.1 Construcción del vector de expresión y clonación en *Escherichia coli*.

La construcción genética pGEX-4T- $\gamma$  establecida en la cepa de expresión BL21DE3 de *E. coli* fue proporcionada amablemente por el Dr. Andrés de la Concha de la Universidad de Texas A&M. Esta clona fue el trabajo del Dr. Z. Zhang y el Dr. de la Concha, realizado en el Departamento de Patobiología en la Universidad de Texas A&M<sup>24</sup>. A partir de mRNA de células sanguíneas mononucleares periféricas de ovino estimuladas con Concanavalina A, éstos investigadores, realizaron una reacción de transcripción reversa en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con los iniciadores delantero (5' ATG AAA TAC ACA AGC TCC 3') y reversa (5' ATT GCA GGC AGG AGA ACC 3') para el gen completo de *oIFN- $\gamma$* . Los productos de RT-PCR se clonaron en el vector pGEM-T (Promega, Madison, WI) de acuerdo al protocolo de Promega Inc (Promega, Madison, WI). La presencia del inserto en el plásmido se verificó mediante la selección cromogénica de X-Gal, seleccionando las colonias blancas. El gen *oIFN- $\gamma$*  clonado no contenía la secuencia péptido señal. Posteriormente, se subclonó el gen mediante la amplificación con los iniciadores delantero (5' CGT GGA TCC CAG GGC CCA TTT TTT AAA G 3') y reverso (5' CCG CTC GAG TTA CAT TGA TGC TCT CCG 3'), los cuales fueron diseñados para introducir los sitios para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I en los extremos 5' y 3' de la secuencia *oIFN- $\gamma$* , respectivamente. Los productos de PCR amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa, se extrajeron mediante fenol/cloroformo, se precipitaron con etanol y se resuspendieron en agua ultrapura. Después de la digestión con enzimas de restricción con *Bam*HI/*Xho*I, los productos de PCR fueron clonados en los sitios de *Bam*HI/*Xho*I del vector procariote de expresión pGEX-4T como una proteína

de fusión con glutatión S transferasa (GST)<sup>26</sup> (Ver cuadro de cepas bacterianas y vectores).

### Cepas bacterianas y Vectores

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| pGEM-T-easy<br>Promega      | Vector de clonación   |
| pGEX<br>Promega             | Vector de expresión   |
| pGEX-4Ty<br>En este estudio | Vector con el inserto <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I incluyendo el gen completo <i>oIFN<math>\gamma</math></i>                       |
|                             |   |
|                             |   |
| <i>E. coli</i> JM101        | <i>supE thi</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) F' [ <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ<math>\Delta</math> M15</i> ] |
| <i>E. coli</i> BL21         | <i>hsdS gal</i> ( $\square$ <i>cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gen 1</i> )   |
|                             |   |

#### 2.2 Verificación del inserto en el plásmido

A partir de las colonias en glicerol de *E. coli* BL21DE3 transformadas con pGEX-4T- $\gamma$ , se tomaron 10  $\mu$ l para inocular 5 ml de medio LB con 25  $\mu$ l de ampicilina (concentración final de 100  $\mu$ g/ml). Los 5 ml de cultivo se incubaron por 12 h a 37 °C con agitación a 250 rpm. De este cultivo se sembró con asa en estría en agar sólido LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Se seleccionaron colonias individuales para la obtención de DNA plásmido de acuerdo al protocolo de Wizard Plus Minipreps DNA purification System (Promega, Madison, WI). El DNA plásmido fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I. Se verificó la presencia del gen mediante electroforesis, de la digestión enzimática, en gel de agarosa al 1%. Además, el plásmido pGEX-4T- $\gamma$ , que liberó el inserto en la digestión enzimática, se mandó secuenciar usando como iniciador delantero (5' CGT GGATCC CAG GGC CCA TTT TTT AAA G 3') y reverso (5' CCG CTC GAG TTA CAT TGA TGC TCT CCG 3') para confirmar la secuencia del gen clonado.

Esta secuencia fue comparada con las secuencias obtenidas del IFN- $\gamma$  caprino<sup>24</sup> (GenBank número de acceso U34232), del IFN- $\gamma$  bovino<sup>22</sup> (GenBank número de acceso M29867), del IFN- $\gamma$  del venado<sup>27</sup> (GenBank número de acceso L07502) y la secuencia de oIFN- $\gamma$  previamente descrita por McInnes y colaboradores<sup>28</sup> (GenBank número de acceso X52640) mediante el método de alineamiento grupal). El método utilizado fue unión de vecinos con el software de MegAlign (DNASTAR Inc, Madison WI), este método organiza las secuencias en agregados al examinar la distancia de las secuencias entre todos los aminoácidos. Estos agregados se alinean en pares y colectivamente como grupos de secuencias de aminoácidos para así, posteriormente alinear los múltiples agregados. Después de que se logra el alineamiento múltiple, se utiliza un método de unión donde se toma el par más cercano entre cada agregado para reconstruir la filogenia del alineamiento putativo. Para dar como resultado que la longitud de cada par de ramas del árbol, representa la distancia entre el alineamiento de secuencias, mientras que las unidades al final del árbol indican el número de sustituciones. Este tipo de árbol proporciona un estimado inicial de las relaciones entre secuencias homólogas.

**2.3 Expresión del gen oIFN- $\gamma$  en la cepa BL21DE3 de *E. coli*.** Se seleccionó una colonia de la caja sembrada con *E. coli* BL21DE3 transformada con pGEX-4T- $\gamma$  positiva al inserto para inocular 3 ml de medio LB adicionado con ampicilina. Se incubó por 12 h; a partir de este tiempo, se tomaron 100  $\mu$ l para inocular 3 ml de LB con ampicilina. Se incubó por 2 h 35 min (hasta obtener una densidad óptica de 0.6) y se les agregó 3  $\mu$ l de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM a cada tubo. Se tomaron muestras de 500  $\mu$ l del cultivo cada hora por un total de 4 h para determinar el tiempo donde se logra la mayor

expresión. Se obtuvieron las proteínas totales de los cultivos inducidos y no inducidos con IPTG. Para lo anterior, se centrifugó a 6000 g x por 30 seg, se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 50 µl de agua estéril y se agregó 50 µl de solución amortiguadora de carga. Las bacterias se lisaron mediante ebullición en baño maría por 3 min.

#### **2.4 SDS-PAGE y Western blot**

Se realizó la electroforesis de la proteína en geles de poliacrilamida con una concentración del 12%. Cada carril del gel se cargó con 15 µl de proteína y 8 µl del marcador SDS PAGE Standards (Bio-Rad Hercules, CA); se corrió en cámara de electroforesis a 90 Volts hasta que pasara el gel concentrador y a 120 Volts por aproximadamente una 1 h hasta que el frente de corrida llegará a la base del gel. La electroforesis se realizó por duplicado, uno de los geles se tiñó en azul de Coomasie y el segundo gel se utilizó para el Western blot usando una membrana de PVDF-TM y la cámara de transferencia (Bio-Rad. Hercules, CA) a 130 Volts por 75 min.

Se utilizó el siguiente protocolo para la inmunodetección: la membrana se lavó con PBS 1X y se puso en solución de bloqueo (20 ml de PBS 1X con 10% de suero de equino) durante toda la noche. Posteriormente se incubó 1 h con anticuerpo policlonal anti-GST de cabra (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) a una dilución de 1:1000. Después de tres lavados con PBS, la membrana se incubó con conjugado peroxidasa de conejo IgG 1000x anti-cabra (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) por una hora a temperatura ambiente. Las proteínas específicas fueron visualizadas al incubar la membrana en el sustrato 4-cloro-1-naftol (CN) con metanol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS a temperatura ambiente hasta alcanzar el color deseado. El revelado de color se detuvo al enjuagar la membrana con agua.

## **2.5 Purificación de la proteína**

Se utilizaron las clonas con el plásmido de expresión pGEX-4T- $\gamma$  se sembraron en 4 ml de medio LB con 20  $\mu$ l de ampicilina y se dejaron incubar a 37 °C con agitación a 250 rpm por 12 h. Se transfirieron 4 ml del cultivo a 400 ml de medio LB y se incubaron por 4 h a 37 °C a 250 rpm. Se produjo la inducción de la proteína de expresión mediante el análogo de la lactosa IPTG y se incubó el medio por 3 h a 37 °C con agitación a 250 rpm. El cultivo se centrifugó a 1500 g x por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 25 ml de PBS refrigerado. La pastilla resuspendida fue sometida a sonicación y posteriormente se centrifugó a 6000 g x por 10 min. Este lisado se agregó a las columnas de purificación Bulk Pack Columns (Amersham Pharmacia City and State) de acuerdo al protocolo recomendado por el laboratorio. Se eluyó la proteína agregando solución amortiguadora de elución glutatión colectando el eluido tres veces a intervalos de 10 minutos.

## **2.6 Prueba de actividad antiviral del roIFN- $\gamma$**

La actividad antiviral inducida por los interferones se mide mediante la inhibición del efecto citopático (ECP) que normalmente resulta de la infección de células Vero con el virus VSV (estomatitis vesicular). En esta prueba, las muestras se titulan en serie y su potencia relativa se compara con una referencia estándar incluida en cada prueba. Esta prueba se realizó mediante la adición de diluciones dobles seriadas de roIFN- $\gamma$  en 50  $\mu$ l 10 veces, una en cada pozo, seguida por la adición de 50  $\mu$ l de cultivo celular de células Vero con 30,000 células por pozo aproximadamente confluentes y resuspendidas en medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium de GIBCO, City and State). Las diluciones de roIFN-

γ y las células se incubaron a 37 °C, con 6% de CO<sub>2</sub> en incubadora humidificada por 12 h. Después se agregaron 100 μl de VSV diluido. La multiplicidad final de infección del VSV es 0.1 (el ratio del virus al número de células es 1 a 10) en medio DMEM y se incubaron por 24 h a 37 °C, 6% de CO<sub>2</sub> en incubadora humidificada. La evaluación del efecto citopático se llevó a cabo después de lavar y fijar las células con formalina al 5% a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se enjuagaron con agua. Se agregaron 100 μl/pozo de cristal violeta y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se enjuagó la placa con agua y se dejó secar para posteriormente ser evaluada en el microscopio invertido de luz.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Construcción del vector de expresión y transformación de *Escherichia coli*

La construcción del vector de expresión pGEX-4T- $\gamma$  así como su posterior transformación en *E. coli* fue exitosa, como lo demostraron las pruebas de verificación realizadas.

#### 3.2 Verificación del inserto en el plásmido

Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, de la digestión con *Bam*HI y *Xho*I del plásmido pGEX-4T- $\gamma$  se verificó la presencia y tamaño del inserto, que para el plásmido fue de 4969 pares de bases, y del inserto 460 pares de bases (Figura 2).

La comparación de las secuencias se presenta en la Cuadro 1. En este cuadro, se puede observar las diferencias existentes en cambios de aminoácidos, el más notorio en la secuencia del gen de IFN- $\gamma$  de la especie bovina.

La construcción del árbol filogenético mediante la comparación de aminoácidos descrita en materiales y métodos entre las especies de bovino, caprino, ovino y cervido, permitió evaluar la similitud de las secuencias para el gen de IFN- $\gamma$  en especies rumiantes (Figura 3).

Con base a la comparación de secuencias del gen del IFN- $\gamma$  se estimaron los valores de similitud que nos indica qué tanto comparten la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos entre las especies evaluadas (Cuadro 2).

#### 3.3 SDS-PAGE y Western blot

Los lisados de *E. coli* inducida con IPTG mostraron una banda bien definida a comparación con el de las no inducidas. La banda de 42 kDa correspondió al peso molecular esperado de ambas proteínas GST y oIFN- $\gamma$ .

La prueba de *Western blot* mostró que la proteína de fusión expresada (GST-roIFN- $\gamma$ ) fue reconocida por el anticuerpo policlonal anti-GST.

### **3.4 Purificación de la proteína**

En total se obtuvo un mililitro de la proteína eludida por 400 ml de cultivo. Mediante SDS-PAGE, se observó que en el eluido se obtienen dos bandas en donde se ubica la proteína de 42 kDa y nuestra proteína asociada a glutatión transferasa, la proteína de fusión GST-roIFN- $\gamma$  (Figura 4).

### **2.5 Prueba de actividad antiviral del roIFN- $\gamma$**

En la dilución  $10^{-1}$  hasta la  $10^{-3}$  de los pozos control de roIFN- $\gamma$  sobre células sin infectar, se observó efecto tóxico del roIFN- $\gamma$  al haber muerte celular y destrucción total de las células. A partir de la dilución de  $10^{-4}$  a la  $10^{-6}$ , se observó menor muerte celular por parte del roIFN- $\gamma$  y de la dilución  $10^{-7}$  a la  $10^{-12}$  todas las células se mantuvieron en buen estado.

En los pozos infectados con VSV, se observaron los mismos resultados de toxicidad por parte del interferón, sin embargo de la dilución  $10^{-7}$  a la  $10^{-12}$  no hubo formación de placas virales y las células se mantuvieron en buen estado debido a la actividad antiviral del interferón.

## DISCUSIÓN

El IFN- $\gamma$  recombinante de ovino fue expresado como proteína fusionada a GST en clonas de *Escherichia coli* utilizando el plásmido pGEX-4T- $\gamma$ . Esta proteína recombinante se purificó mediante afinidad y se utilizó para probar su actividad antiviral *in-vitro* contra el virus de la estomatitis vesicular (VSV) exitosamente.

Conociendo las múltiples actividades que tiene el IFN- $\gamma$ , el papel que juega en la inmunidad del huésped a enfermedades ocasionadas tanto por virus como bacterias, así como su aplicación en las técnicas diagnósticas hace necesario la disponibilidad del IFN- $\gamma$  recombinante de ovino.

Además, se estableció que el IFN- $\gamma$  producto de este proyecto tiene gran similitud con la secuencia reportada por McInnes<sup>28</sup> con una diferencia de 6 aminoácidos y ambas secuencias se relacionan filogenéticamente con las correspondientes al IFN- $\gamma$  de cabra, de bovino y del ciervo. Esta diferencia de aminoácidos sin embargo, parece no afectar la actividad biológica del interferón cuando se evaluó su actividad antiviral. Los resultados de esta investigación también sugieren que el IFN- $\gamma$  recombinante tiene un uso terapéutico potencial en estas especies. La diferencia entre secuencias de clonas de cDNA de IFN- $\gamma$  de bovino ya se ha reportado anteriormente<sup>29,30</sup>, sin embargo esto no ha impedido el uso del IFN- $\gamma$  recombinante en especies rumiantes relacionadas, ya que tiene reactividad cruzada en ésta y es biológicamente activo. Lo que no sucede en otras especies.

La construcción del árbol filogenético mediante la comparación de aminoácidos descrita en materiales y métodos entre las especies de bovino, caprino, ovino y cérvidos, permitió evaluar la similitud de las secuencias para el gen de IFN- $\gamma$  en especies rumiantes (Figura 3). En este se observa una asociación más estrecha entre la secuencia obtenida en

este trabajo y la reportada por McInnes<sup>28</sup>. De manera más distante se asocia la secuencia del IFN- $\gamma$  de cabra, de bovino y aun más distante la de IFN- $\gamma$  del ciervo.

Los resultados de la presente investigación podrán encontrar una aplicación en diversas áreas de la producción y diagnóstico de enfermedades para los ovinos.

El IFN- $\gamma$  puede ser utilizado para diagnóstico de enfermedades como *Corynebacterium pseudotuberculosis*<sup>31</sup>. Enfermedad que afecta a borregos y cabras causando la linfadenitis caseosa, ya que se ha probado que el uso de la prueba basada en la detección de la respuesta de IFN- $\gamma$  a antígenos de células completas, tiene valor en la detección de esta infección en borregos<sup>31</sup>. Los estudios realizados en el pasado sobre esta prueba, utilizaron IFN- $\gamma$  de bovino, observando que la densidad de valores ópticos en ovinos nunca alcanzaron aquellos registrados para bovinos con tuberculosis. La diferencia en la sensibilidad de estas pruebas se relacionó a una mayor severidad de la infección por tuberculosis en los bovinos. Sin embargo, Prescott y colaboradores observaron que sí existe una relación entre la severidad de la infección en borregos y la respuesta al IFN- $\gamma$ , pero concluyeron que aun falta realizar estudios con mayor número de animales<sup>31</sup>.

Aun no se ha investigado a fondo si la prueba del IFN- $\gamma$  para el diagnóstico de tuberculosis es menos sensible en ovinos que en bovinos. Si tomamos en cuenta que el IFN- $\gamma$  es específico de especie, a pesar de tener reactividad cruzada en ruminantes, si se utilizaran anticuerpos monoclonales contra el IFN- $\gamma$  recombinante del ovino, la sensibilidad de la prueba podría aumentar porque sería más específica.

El IFN- $\gamma$  de bovino ya se utiliza para el diagnóstico de tuberculosis en el ganado bovino, se ha utilizado para diagnosticar la paratuberculosis subclínica<sup>17</sup> y para el diagnóstico de linfadenitis caseosa en ovinos<sup>31</sup>. El IFN- $\gamma$  recombinante de ovino podría utilizarse para diseñar otras pruebas diagnósticas para enfermedades que estimulan una fuerte respuesta inmune celular. Debido a que el IFN- $\gamma$  se libera predominantemente por células T en respuesta a estímulos antigénicos y se libera *in vitro* en cantidades que se pueden medir fácilmente por inmunoanálisis de enzimas (EIA) y, a diferencia de la interleucina-2, el IFN- $\gamma$  aparentemente no se consume en cultivos de corta duración<sup>32</sup> lo que lo hace una excelente citocina para utilizarse en el diagnóstico.

La prueba IFN- $\gamma$  puede ser de valor para el diagnóstico de otras enfermedades en los ruminantes causadas por micobacterias como la paratuberculosis o enfermedad de Johne<sup>15</sup>, pero también por otras bacterias como la brucelosis<sup>28</sup>, o para el diagnóstico de enfermedades virales como el virus orf ovino<sup>9</sup>.

Aún falta realizar estudios para determinar el uso del IFN- $\gamma$  recombinante de ovino como terapéutico. El IFN- $\gamma$  de bovino se ha utilizado en el tratamiento del complejo respiratorio de los bovinos<sup>6</sup>. Consecuentemente, el rIFN- $\gamma$  se podría utilizar el tratamiento del complejo respiratorio de los ovinos.

Se requerirán más estudios para establecer las actividades antiproliferativas e inmunes del IFN- $\gamma$  recombinante de ovino en modelos *in vitro* e *in vivo*, sin embargo el presente trabajo podrá servir para sentar las bases de estudios posteriores así como modelo para la clonación y secuenciación de otras citocinas del ovino.

**CONCLUSIONES**

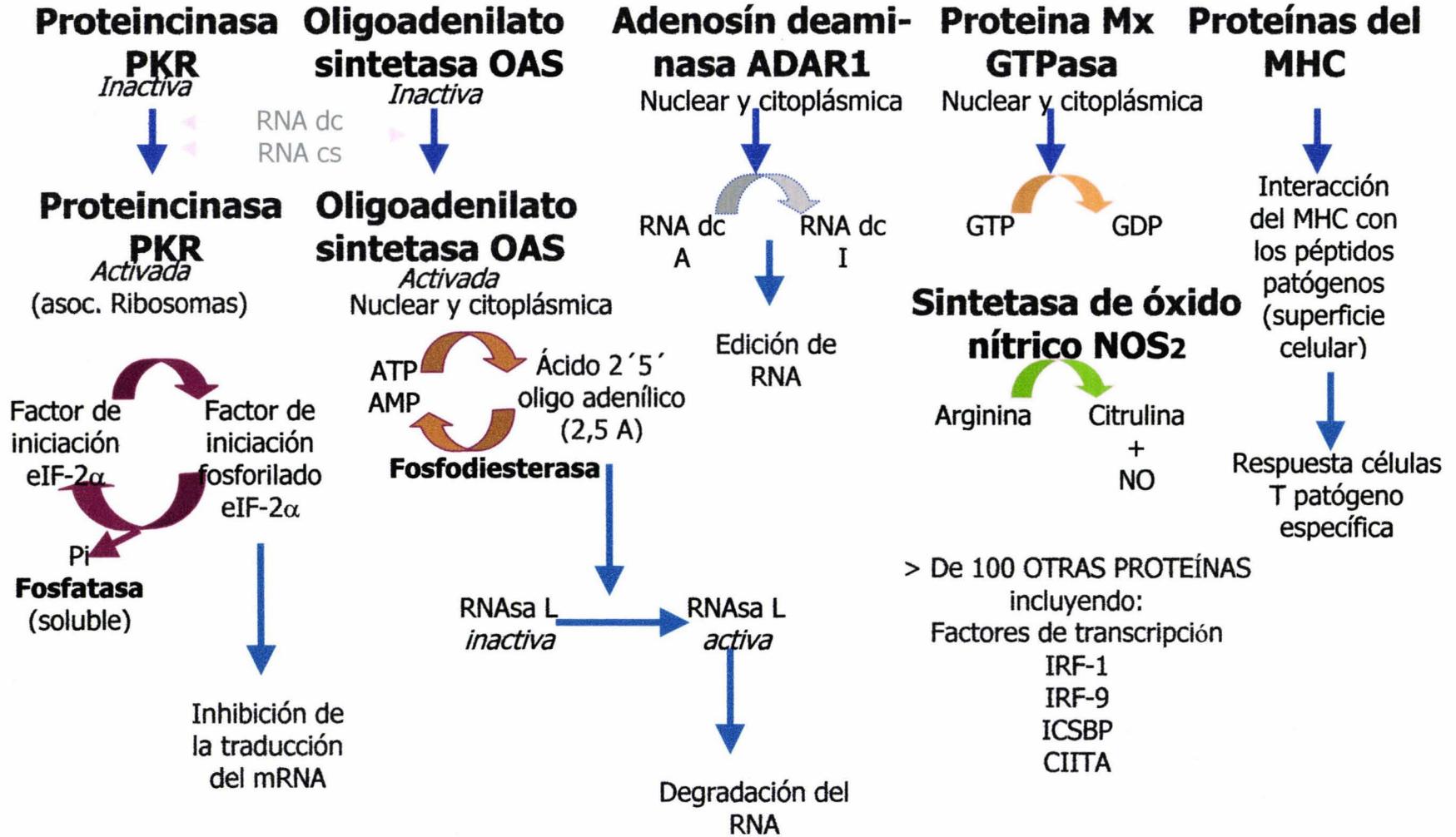
- La secuencia que codifica el IFN- $\gamma$  ovino tiene gran similitud con la secuencia del IFN- $\gamma$  ovino antes descrita y ambas secuencias se relacionan filogenéticamente con las correspondientes del IFN- $\gamma$  de cabra, de bovino y de venado.
- El oIFN- $\gamma$  recombinante producido en *E. coli* tiene potente actividad antivirica *in vitro* contra el virus de la estomatitis vesicular (VSV).

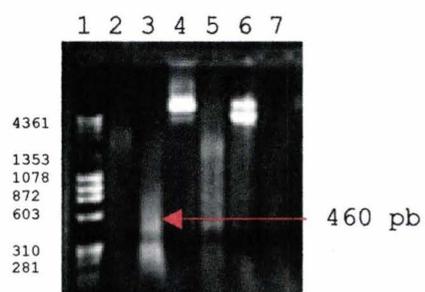
**PERSPECTIVAS**

- Se requiere más investigación sobre la aplicación de ésta proteína recombinante para poder evaluar su posible uso en modelos animales, así como un mejor conocimiento de la regulación de la expresión del interferón para reducir sus efectos tóxicos.

**Respuesta por una sola célula**

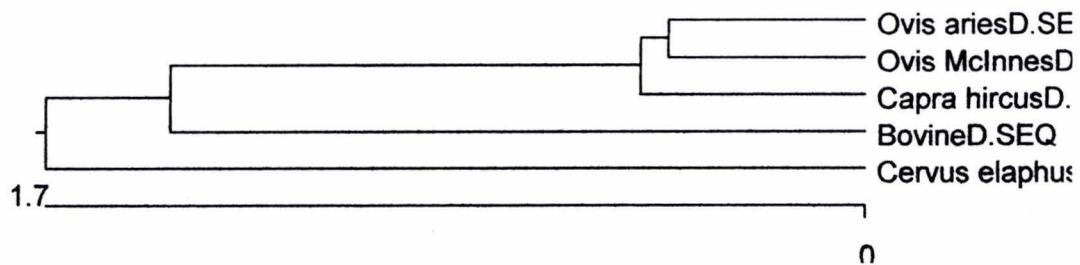
**Respuesta por múltiples células**





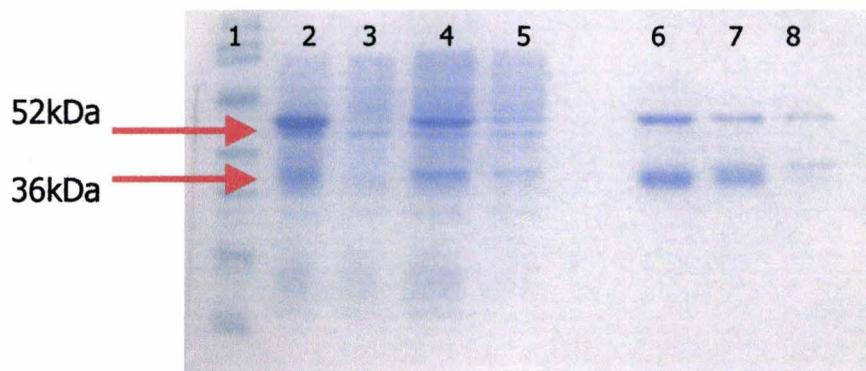
**Fig. 2 Electroforesis de la digestiones enzimáticas de pGEX-4T- $\gamma$ .**

Carril 1 = Marcador de peso molecular $\lambda$  + *Hind* III y *PhiX* + *Hae* III,  
carril 3 = plásmido digerido con *Bam*HI y *Xho*I y carriles 4 y 6= plásmido  
sin digerir.



**Figura 3. Árbol de la relaciones filogenéticas de IFN- $\gamma$  en varias especies de rumiantes.**

Relaciones filogenéticas compatibles con el alineamiento de las secuencias de rumiantes. La distancia de cada par de ramas representa la distancia entre pares de secuencias, mientras que las unidades al final del árbol indican el número de eventos de sustitución (a medida que están más emparentados se acerca más a cero).



**Fig. 4 SDS-PAGE de proteínas totales y eluciones**

Carril 1 = Marcador (Estándar preteñida Sodio Dudodecil Sulfato-Gel de pliacrilamida BIORAD), carriles 2 Y 4 =PGEX4T- $\gamma$  inducido, carriles 3 y 5= PGEX4T- $\gamma$  sin inducir, carril 6=IFN $\gamma$  del primer eluído, carril 7=IFN $\gamma$  del segundo eluído y carril 8=IFN $\gamma$  del tercer eluído

Cuadro 1. Comparación de secuencias de aminoácidos del IFN-γ en varias especies de rumiantes mediante el programa computacional MegAlign 4.03

DNASTAR, Inc.

|     |   |                 |
|-----|---|-----------------|
|     | X A R A H F L K K - K T - R S I L M Q V T Q M - L R V G L F | Secuencia       |
|     |   | consenso        |
|     | 10 20 30  |                 |
| 1   | M A R A N F L E K . K T . R S I L M Q V A Q M . L R V G L S | BovineD.SEQ     |
| 1   | X X R A H F L K K . K T . R S I L M Q V T Q M . L R V G L F | Ovis ariesD.SEQ |
| 1   | X A R A H F L K K . K T . R S I L M Q V T Q M . L R V G L F | Capra hircusD.S |
| 1   | X X R A H F L K K . K T . R S I L M Q V T Q M . L R V G L F | Cervus elaphusD |
| 1   | X A R A H F L K K . K T . R S I L M Q V T Q M . L R V G L F | Ovis McInnesD.S |
|     | S Q K F - R I G K R R V T K R L F R A K L S P S T S N S L K | Secuencia       |
|     |   | consenso        |
|     | 40 50 60  |                 |
| 91  | S Q K F . R I G K M K V T K K L F R A K L S P S T S N S L K | BovineD.SEQ     |
| 85  | S Q K F . R I G K R R A T K R L F R A K L S P S T S N S L K | Ovis ariesD.SEQ |
| 88  | S Q K F . R I G K R R V T K R L F R A K L S P S T S N S L K | Capra hircusD.S |
| 85  | S . K F . R I G K R R V T E K L F R A K L S P S T S N S L K | Cervus elaphusD |
| 88  | S Q K F . R I G K R R V T K R L F R A K L S P S T S N S L K | Ovis McInnesD.S |
|     | T S K I T R S F K G A W I S S S K T C F R S S - M A A L R N | Secuencia       |
|     |   | consenso        |
|     | 70 80 90  |                 |
| 181 | T S K I T R S F K G A W I S S S K T C F R S S . M A A L R N | BovineD.SEQ     |
| 175 | T S K I T R S F K G A W I S S S K T C F R S S . M A A L R N | Ovis ariesD.SEQ |
| 178 | T S K I T R S F K G A W I S S S K T C F R S S . T A A L R N | Capra hircusD.S |
| 175 | T S K I T R S F R G A W I S S S K T C F R S S . M A A L R N | Cervus elaphusD |
| 178 | T S K I T R S F K G A W I S S S K T C F R S S . T A A L R N | Ovis McInnesD.S |
|     | W R T S K S - F K F X V D D L Q I Q R K A I N E L I K V M N | Secuencia       |
|     |   | consenso        |
|     | 100 110 120   |                 |
| 271 | W R T S K S . F K F X V D D L Q I Q R K A I N E L I K V M N | BovineD.SEQ     |
| 265 | W R F S K G . F K L F V D D L Q I Q R K A I N E L I K V M N | Ovis ariesD.SEQ |
| 268 | W R T S K S . F K F X V D D L Q I Q R K A I N E L I K V M N | Capra hircusD.S |
| 265 | W R T S K S . F K F X V D D L Q I Q R K A I N E L I K V M N | Cervus elaphusD |
| 268 | W R T S K G . F K F X V D D L Q I Q R K A I N E L I K V M N | Ovis McInnesD.S |
|     | D L S P K S - P Q K A E E K S E S L S R P E - -             | Secuencia       |
|     |   | consenso        |
|     | 130 140   |                 |
| 358 | D L S P K S . P Q K A E E K S E S L S R P E                 | BovineD.SEQ     |
| 355 | D L S P K Y . P Q K X X X X X X X X X X X X                 | Ovis ariesD.SEQ |
| 355 | D L S P K S . P Q K A E E K S E S L S R P E                 | Capra hircusD.S |
| 355 | D L S P K S . P Q K A E E K S E S L S R P E S               | Cervus elaphusD |
| 355 | D L S P K S . P Q K A E E K S E S L S R P E                 | Ovis McInnesD.S |

■ Aminoácidos que difieren entre las diferentes secuencias

**Cuadro 2. Valores de similitud de las secuencias del gen de IFN- $\gamma$  en de diferentes especies de rumiantes**

|          | <i>Bovine</i> | <i>Ovis</i> | <i>Capra</i> | <i>Cervus</i> | <i>Ovis Mc</i> |
|----------|---------------|-------------|--------------|---------------|----------------|
| Bovine   | 100           | 92.5        | 97.6         | 96.2          | 97.2           |
| Ovis a   | 3.5           | 100         | 94.6         | 92.3          | 95.1           |
| Capra h  | 2.4           | 1.3         | 100          | 97.2          | 99.5           |
| Cervus e | 3.7           | 3.5         | 2.7          | 100           | 96.7           |
| Ovis Mc  | 2.9           | 0.8         | 0.5          | 3.2           | 100            |

\*\*La distancia de los pares:

Triángulo superior: Porcentaje de similitud

Triángulo inferior: Porcentaje de divergencia

## ABREVIATURAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>IFN</b>      | Interferón  |
| <b>IFNs</b>     | Interferones  |
| <b>NK</b>       | Células naturalmente asesinas   |
| <b>IGIF</b>     | Factor de inducción de interferón gamma (Inducing Gamma Interferon Factor)                            |
| <b>IRF</b>      | Factor de regulación del interferón (Interferon regulatory factor)                                    |
| <b>ICBS</b>     | Proteína de unión a secuencia consenso del interferón (Interferon consensus séquence binding protein) |
| <b>CIITA</b>    | Transactivador clase II (Class II transactivator)   |
| <b>MHC</b>      | Complejo de histocompatibilidad mayor   |
| <b>VSV</b>      | Virus de la estomatitis vesicular   |
| <b>RT-PCR</b>   | Reacción de transcripción reversa en cadena de la polimerasa  |
| <b>IPTG</b>     | Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido  |
| <b>SDS-PAGE</b> | Sodio-duodecil-sulfato gel de poliacrilamida  |
| <b>GST</b>      | Glutathione S Transferasa   |
| <b>Rpm</b>      | revoluciones por minuto   |
| <b>ECP</b>      | Efecto citopático   |
| <b>EIA</b>      | Inmunoanálisis de enzimas   |

## LITERATURA CITADA

- (1) Samuels CE. Antiviral Actions of Interferon Interferon-Regulated Cellular Proteins and Their Surprisingly Selective Antiviral Activities. *Virology* 1991; 183:1-11.
- (2) Sen GC, Lengyel P. The Interferon System A Bird's Eye View of Its Biochemistry. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267:5017-5020.
- (3) Shtrichman F, Samuel CE. The Role of Gamma Interferon in Antimicrobial Immunity. *Current Opinion in Microbiology* 2001; 4:251-259.
- (4) Radford AJ, Hodgson ALM, Rothel JS, Wood PR. Cloning and Sequencing of the Ovine Gamma-Interferon Gene. *Australian Veterinary Journal* 1991; 68:82-84.
- (5) Martal JL, Chene NM, Huynh LP, L'Harydon RM, Reinaud PB, Guillomot MW et al. IFN-tau: A novel subtype I IFN1. Structural Characteristics, Non-Ubiquitous Expression, Structure-Function Relationships, a Pregnancy Hormonal Emryonic Signal and Cross-Species Therapeutic Potentialities. *Biochimie* 1998; 80:755-777.
- (6) Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K et al. Cloning of the cDNA for Human IFN- $\gamma$ -Inducing Factor, Expression in *Escherichia coli*, and Studies on the Biologic Activities of the Protein. *Journal of Immunology* 1996; 156:4274-4279.
- (7) Schmidt P, Ludt C, Kuhn C, Buitkamp J. A Diallelic Tetranucleotide Repeat, (GT(3))(5 Or 6), within Intron 1 of the Ovine Interferon-Gamma Gene. *Animal Genetics* 1996; 27:437.
- (8) Bielefeldt OH, Lawman JP, Babiuk LA. Bovine interferon: Its Biology and Application in Veterinary Medicine. *Antiviral Research* 1987; 7:187-210.
- (9) Haig DM, Deane DL, Myatt N, Thomson J, Entrican G, Rothel J et al. The Activation Status of Ovine CD45R+ And CD45R- Efferent Lymph T Cells after Orf Virus Reinfection. *Journal of Comparative Pathology* 1996; 115:163-174.
- (10) Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An Essential Role for Interferon  $\gamma$  in Resistance to *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Journal of Experimental Medicine* 1993; 178:2249-2254.
- (11) Mastroeni P, Clare S, Khan S, Harrison JA, Hormaeche CE, Okamura H et al. Interleukin 18 Contributes to Host Resistance and Gamma Interferon Production in Mice Infected with Virulent *Salmonella Typhimurium*. *Infection and Immunity* 1999; 67:478-483.

- (12) Swihart K, Fruth U, Messmer N, Hug K, Behin R, Huan S et al. Mice From a Genetically Resistant Background Lacking the Interferon Gamma Receptor are Susceptible to Infection with *Leishmania Major* but Mount a Polarized T Helper Cell Type CD4+ T Cell Response. *Journal of Experimental Medicine* 1995; 181:961-971.
- (13) Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN Gamma Receptor: a Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annual Reviews in Immunology* 1997; 15:563-591.
- (14) Gonzalez Llamazares OR, Gutierrez Martin CB, Alvarez Nistal D, de la Puente Redondo VA, Dominguez Rodriguez L, Rodriguez Ferri EF. Field Evaluation of the Single Intradermal Cervical Tuberculin Test and the Interferon- $\gamma$  Assay for Detection and Erradication of Bovine Tuberculosis in Spain. *Veterinary Microbiology* 1999; 70:55-66.
- (15) Jungersen G, Huda A, Hansen JJ, Lind P. Interpretation of the Gamma Interferon Test for Diagnosis of Subclinical Paratuberculosis in Cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; 9:453-460.
- (16) Aggers EM, Andersen P. Tuberculosis Subunit Vaccine Development: on the Role of Interferon- $\gamma$ . *Vaccine* 2001; 17:2298-2302
- (17) Pearl JE, Saunders B, Ehlers S, Orme IM, Cooper AM. Inflammation and Lymphocyte Activation during Mycobacterial Infection in the Interferon- $\gamma$ -Deficient Mouse. *Cellular immunology* 2001; 211: 43-50
- (18) Dian C, Eshaghi S, Urbig T, McSweeney S, Heijbel A, Salbert G et al. Strategies for the Purification and On-Column Cleavage of Glutathione-S-Transferase Fusion Target Proteins. *Journal of Chromatography Biology* 2002; 769:133-144.
- (19) Gray PW, Goeddel DV. Cloning and Expression of Murine Immune Interferon cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983; 80:5842-5846.
- (20) Houard SA, Jacquet A, Haumont M, Glineur F, Daminet V, Milican F et al. Cloning, Expression and Purification of Recombinant Cotton Rat Interferon-gamma. *Gene* 1999; 240:107-113.
- (21) Slobbe L, Lockhart E, Kelly J, Buchan G. The Production and Biological Assessment of Cervine Interferon Gamma. *Cytokine* 2000; 12:1211-1217
- (22) Cerretti DP, McKereghan K, Larsen A, Cosman D, Gillis S, Baker PE. Cloning, Sequence and Expression of Bovine Interferon Gamma. *Journal of Immunology* 1983; 136:4561-4564.
- (23) Gray PW, Leung DW, Pennica D, Yelverton E, Najarian R, Simonsen CC et al. Expression of Human Immune Interferon Cdna in *E. Coli* and Monkey Cells. *Nature* 1982; 295:503-508.
- (24) Beyer JC, Stich RW, Hoover DS, Brown WC, Cheevers WP. Cloning and Expression of Caprine Interferon Gamma. *Gene* 1998; 210:103-108.

- (25) Billman-Jacobe H, Hodgson ALM, Lightowers M, Wood PR, Radford AJ. Expression of Ovine Gamma Interferon in *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. Applied and Environmental Microbiology 1994; 60:1641-1645.
- (26) Zhang Z, de la Concha Bermejillo A Cloning and Expression of Ovine Interferon Gamma( $\gamma$ ): Sheep and Goat, Wool and Mohair CPR 2002.114-120
- (27) Slobbe L, Crawford A.M., Griffin J.F.T., Buchan G. Cloning and Sequencing of Cervine Gamma Interferon (Abstract). Unpublished 1992.
- (28) McInnes CJ, Logan M, Redmond J, Entrican G, Baird GD. The Molecular Cloning of the Ovine Gamma-Interferon cDNA using the Polymerase Chain Reaction. Nucleic Acids Research 1990; 18: 4012
- (29) Streeton J.A., Desem N, Jones S.L. Sensitivity and Specificity of a Gamma Interferon Blood Test for Tuberculosis Infection. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 1998; 2:443-450.
- (30) Converse P.J., Jones S.L., Astemborski J., Vlahov D, Graham N.M.H. Comparison of a Tuberculin Interferon- $\gamma$  Assay with the Tuberculin Skin Test in High-Risk Adults: Effect of Human Immunodeficiency Virus Infection. Journal of Infectious Disease 1997; 176:144-150.
- (31) Prescott J.F., Menzies P.I., Hwang Y.T. An Interferon-Gamma Assay for Diagnosis of *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Infection in Adult Sheep from a research Flock. Veterinary Microbiology 2002; 88:287-297.
- (32) Wood P.R., Jones S.L. BOVIGAM™: An in Vitro Cellular Diagnostic Test for Bovine Tuberculosis. Tuberculosis 2001; 81:147-155.
- (33) Weynants V, Godfroid J., Limbourg B, Saegerman C, Letteson J-J. Specific Bovine Brucellosis Diagnosed on in Vitro Antigen-Specific Gamma Interferon Production. Journal of Clinical Microbiology 1995; 33:706-712.
- (34) Collins R.A, Camon E.B., Chaplin P.J., Howard C.J. Influence of IL-12 on Interferon-Gamma Production by Bovine Leucocyte Subsets in Response to Bovine Respiratory Syncytial Virus. Veterinary Immunology & Immunopathology 1996; 63:69-72.
- (35) Godfroid J., Czaplicki G, Kerkhofs P. Assessment of the Cell-Mediated Immunity in Cattle Infection after Bovine Herpesvirus 4 Infection, using an *in-vitro* Antigen-Specific Interferon- $\gamma$  Assay. Veterinary Microbiology 1996; 53:133-141.
- (36) Rhobes S.G., Cocksedge J.M., Collins R.A, Morrison W.I. Differential Cytokine Responses of CD4+ Y CD8+ T Cells in Response to Bovine Viral Diarrhoea Virus in Cattle. J Gen Virol 1999; 80:1673-1679.

- (37) Davidson P.M, Creati I., Wood P.R., Robertson D M, Hosking C.S. Lymphocyte production of gamma-interferon. A Test for Non-Tuberculous Mycobacterial Lymphadenitis in Childhood. European Journal of Pediatrics 1993; 152:31-35.
- (38) Weir R.E, Morgan A.R., Britton W.J., Butlin C.R., Dockrell H.M. Development of a Whole Blood Assay to Measure T Cell Responses to Leprosy: A New Tool for Immuno-Epidemiological Field Studies of Leprosy Immunity. Journal of Immunological Methods 1994; 176:93-101.
- (39) Derynck R. More about Interferon Cloning. 1st edition ed. New York: Academic Press, 1983.
- (40) Wood PR, Seow HF. T Cell Cytokines and Disease Prevention. Veterinary Immunology and Immunopathology 1996; 54:33-44
- (41) Patterson JB, Thomas DC, Hans SL, Samuel CE. Mechanism of Interferon Action: Double-Stranded RNA-Specific Adenosine Deaminase from Human Cells is Inducible by Alpha and Gamma Interferons. Journal of Virology 1995; 210: 508-511
- (42) LaFleur DW, Nardelli B, Tsareva T, Mather D, Feng P, Semenuk M, Taylor K, Buergin M, Chinchilla D, Roshke V, Chen G, Ruben SM, Pitha PM, Coleman TA, Moore PA. Interferon- $\kappa$ , a Novel Type I Interferon Expressed in Human Keratinocytes. The Journal Of Biological Chemistry 2001; 276: 39765-39771
- (43) Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. The Interleukin-12/Interleukin-12-receptor System: Role in Normal and Pathologic Immune Responses. Annual Reviews Immunology 1998; 16: 495-521
- (44) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 Regulates Both TH1 and TH2. Responses Annual Reviews Immunology 2001; 19: 423-474
- (45) Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated Tuberculosis in Interferon  $\gamma$  Gene-disrupted Mice. Journal of Experimental Medicine 1993; 178: 2243-2247
- (46) Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma interferon in whole blood culture. Australian Veterinary Journal 1992; 69; 1-4