



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

CONSTRUCCIÓN DEL GEN DE INTERFERÓN TIPO I
PORCINO PARA SU EXPRESIÓN EN *Escherichia*
coli COMO PROTEÍNA RECOMBINANTE.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

YADIRA ALEJANDRA RAMÍREZ ROBLES

ASESORES:

Dr. JAIME CAMPUZANO GRANADOS

Dr. JOSÉ ALBERTO CANO BUENDÍA



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatoria

A mis padres, Celia y Sinecio, por ser una fuente inagotable de inspiración y apoyo para alcanzar mis metas. Por estar a mi lado en cada paso y alentarme a seguir siempre adelante. Por su paciencia y amorosos consejos. Por el gran ejemplo de fortaleza y perseverancia que siempre me han dado. Y por el incondicional amor que me ha alimentado durante todos estos años. Por todo eso y más: ¡muchas gracias!

A mi tía Male, por ser mi segunda mamá. Por llenarme de energía a cada momento. Por procurarme y hablar cada noche. Por tener las palabras de aliento precisas en cada momento. Por ser una hermosa fuente de inspiración y el más bello ejemplo de fortaleza. Gracias infinitas.

A mis hermanas, Karla y Jaz, por ser mis mejores amigas. Por el camino recorrido a su lado. Por verlas crecer y ayudarme a hacerlo también. Por el hermoso tiempo a su lado. Por despertarme a media noche para estudiar y soportar mi mal genio. Sin ustedes no sería lo que soy y no estaría en donde estoy. Gracias por las risas, el llanto y la plena felicidad a su lado.

A mi madrina Carmela, que aunque ya no está con nosotros, siento su presencia en cada paso que doy. A mi padrino Luis, a Luis Alberto, a Laura, a Magali y a Ely. Gracias por todo su amor.

A la familia Ramírez. Gracias por su amor y su apoyo.

A mis cuñados, Gabriel y Pepe.

A mis amigos, que son mi familia por elección. Por el tiempo compartido, las risas, los desvelos, las enseñanzas, las pláticas, los consejos, los aprendizajes juntos, los sueños compartidos y sobre todo por su confianza, apoyo y amor incondicionales.

De la UVM a Alan y Pedro. Por seguir presentes y ser una bonita constante en mi vida.

De la UNAM a esas lindas personitas que la vida se encargó de poner en mi camino para hacerlo mucho más ameno e interesante: Dafne, Diana, Ana, Roberto, Gabo, Pedro, Inga, Maleny, Rodrigo, Julian, Rafa, Coral, Sadyd, Magui.

Del Departamento de Microbiología a todos los que me brindaron su amistad y apoyo incondicional y me ayudaron en una parte muy importante de mi desarrollo personal y profesional, y de quienes no he recibido más que palabras y acciones sinceras y he aprendido muchísimo. A Quique, por el apoyo incondicional durante todo el proyecto y en esta nueva etapa. Por sus acertados consejos y hacer de mi estancia en el laboratorio algo muy lindo a Isa, Jos, Adolfo (también por molestarme), Víctor, Nina, Lázaro, Nao, Silvia, Raúl, Andrés, Lili, Pato, Erwin, Mariana. Al Dr. Basurto y la Dra. Fabi.

Y a todos aquellos que directa e indirectamente me ayudaron a construir paso a paso el camino. Gracias.

Agradecimientos

Al Departamento de Microbiología e Inmunología y en especial al Laboratorio de Vacunología y Constatación. A los demás laboratorios del departamento que me permitieron el uso de equipos y reactivos.

A los Doctores Jaime Campuzano Granados y José Alberto Cano Buendía por su asesoría y constante apoyo en el desarrollo del proyecto y por el aliento a seguir desarrollándome profesionalmente.

A los miembros del honorable jurado por sus amables y acertadas correcciones:

Presidenta: Alejandra Mercadillo Sierra
Vocal: Rodrigo Mena Bañuelos
Secretario: José Iván Sánchez Betancourt
Suplente: Verónica Rojas Trejo
Suplente: José Alberto Cano Buendía

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por la beca otorgada y por el financiamiento del proyecto IN217314.

CONTENIDO

Unidad	Tema	Página
	Resumen	1
1.	Introducción	2
1.1	Interferón	3
1.1.1	Expresión del interferón	7
1.1.2	Mecanismo de activación	10
1.1.3	Actividad antiviral a través de los genes estimulados por interferón (ISGs)	14
1.1.4	Efectos de los interferones alfa y beta sobre células del sistema inmune	18
1.2	Interferones recombinantes	22
1.2.1	Optimización de secuencias	28
2.	Justificación	30
3.	Hipótesis	31
4.	Objetivos	32
4.1	Objetivo general	32
4.2	Objetivos particulares	32
5.	Materiales y métodos	33
5.1	Análisis de las secuencias	33
5.2	Optimización de las secuencias y construcción de los genes de INF α/β	33
5.3	Clonación en el vector cloneJET	36

5.4	Digestión y subclonación en el vector de expresión pBAD Myc/His A	39
5.5	Secuenciación de las construcciones y expresión de las proteínas	40
5.6	Análisis e identificación de las proteínas	44
6.	Resultados y discusión	45
6.1	Análisis de las secuencias	45
6.2	Optimización de las secuencias y construcción de los genes de interferón alfa y beta porcino	46
6.3	Clonación en el vector cloneJET	50
6.4	Digestión y subclonación en el vector de expresión pBAD Myc/His A	52
6.5	Secuenciación de las construcciones y expresión de las proteínas	56
6.6	Análisis e identificación de las proteínas	59
7.	Conclusiones	65
8.	Prospectiva	66
	Anexo 1	67
	Anexo 2	69
	Anexo 3	71
	Referencias	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1	Modelo en 3D de los interferones alfa y beta porcino	4
Figura 2	Expresión y mecanismo de activación de los interferones alfa y beta	13
Figura 3	Secuencias originales de los genes de los interferones alfa y beta porcino	46
Figura 4	Alineamiento de las secuencias originales con las optimizadas de los genes de los interferones alfa y beta porcino	47
Figura 5	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos original y optimizada del interferón alfa porcino	49
Figura 6	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos original y optimizada de interferón beta porcino	49
Figura 7	Alineamiento de los oligos diseñados para la construcción de los genes de los interferones alfa y beta porcino	50
Figura 8	Ensamblaje y amplificación de los genes de interferón alfa y beta porcino en gel de agarosa al 1%	51
Figura 9	Mapas de clonación de los genes de interferón alfa y beta porcino en el vector CloneJET	52

Figura 10	Doble digestión de las construcciones en el vector CloneJET en gel de agarosa al 1%	53
Figura 11	Doble digestión del vector pBAD Myc-His A en gel de agarosa al 1%	54
Figura 12	Esquema de digestión del vector e insertos, y reacción de ligación	55
Figura 13	Mapas de construcciones en el vector de expresión pBAD.	55
Figura 14	Transformación en <i>E. coli</i> Top10 en agar LB con 150 µg/mL de ampicilina	56
Figura 15	PCR de colonia de las transformaciones en <i>E. coli</i> Top10 en gel de agarosa al 1%	57
Figura 16	Transformación en <i>E. coli</i> BL21 en agar LB con 150 µg/mL de ampicilina	58
Figura 17	PCR de colonia de las transformaciones en <i>E. coli</i> BL21 en gel de agarosa al 1%	58
Figura 18	Comparación de la secuenciación con la secuencia optimizada de los genes de interferón alfa y beta porcino y sus cromatogramas.	59
Figura 19	Análisis de las proteínas de interferón alfa y beta porcino recombinantes.	61
Figura 20	Identificación del interferón alfa porcino recombinante en membrana de PVDF con anticuerpos anti-His con diferentes concentraciones del inductor.	62
Figura 21	Identificación del interferón alfa porcino recombinante en membrana de PVDF con anticuerpos anti-His con diferentes tiempos de incubación.	63

Figura 22

Identificación del interferón beta porcino recombinante en membrana de PVDF con anticuerpos anti-His con diferentes tiempos de incubación.

64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
Cuadro 1.	Constantes de ensamblaje y amplificación de los genes de interferón alfa y beta porcino.	36
Cuadro 2.	Constantes de PCR de colonia.	39
Cuadro 3.	Concentraciones del inductor L-arabinosa en soluciones stock y concentraciones finales al realizar dilución 1:100.	43
Cuadro 4.	Comparación de las secuencias genéticas originales con las optimizadas de los interferones alfa y beta porcino.	48

Abreviaturas

%GC	Porcentaje de guanina y citosina
°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitro
µM	Micromolar
2-5^a	2'-5'oligo-adenilato
Aa	Aminoácidos
ADAR	Adenosindeaminasa
AMP	Adenosín monofosfato cíclico
Anti-His	Anti-histidinas
ApaI	Enzima de restricción
APC	Células presentadoras de antígeno
APOBEC	Apolipoproteína B semejante a polipéptido catalítico
ATF2	Factor de activación de la transcripción
BSA	Albúmina bovina
CAI	Índice de adaptación de codones
Cpb	Cuanto baste para
CBP	Proteína de unión co-activadora CREB
cDNA	DNA complementario
cGAMP	Guanosina monofosfato-adenosina monofosfato cíclica
cGAS	Sintetasa GMP-AMP cíclica
CpG	Citosina y Guanina
CREB	cAMP response element-binding
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucléico

dsRNA	RNA de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GMP	Guanosina monofosfato cíclico
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
GU	Guanina y uracilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta afinidad
HRP	Per oxidasa del rábano
IFITMs	Proteínas transmembranales inducidas por interferón
IFN	Interferón
IFNs	Interferones
IFNα, β, ω, δ, γ y λ	Interferón alfa, beta, omega, delta, gama y lambda
Ig	Inmunoglobulina
IKKα, β, ϵ	Cinasa alfa, beta y epsilon
IL	Interleucina
INFAR	Receptor de los interferones
IRF	Factores estimuladores del interferón
ISGs	Genes estimulados por interferón
JAK/STAT	Janus cinasas/Señal activadora de la transducción
kDa	Kilodaltones
LC3	Light chain 3
LB	Luria Bertani
MAVS	Proteína adaptadora de la señalización mitocondrial
MDA5	Proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mL	Mililitro

mRNA	RNA mensajero
Mx	Resistencia a mixovirus
MyD88	Respuesta de diferenciación mieloide primaria gen 88
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NcoI	Enzima de restricción
NFκB	Factor nuclear kappa B
Ng	Nanogramos
NK	Células asesinas naturales
NO	Óxido nítrico
OD₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanómetros
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
Pb	Pares de bases
PBS	Solución tamponada de fosfatos
pCDs	Células dendríticas plasmocitoides
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKR	Proteína cinasa R
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PRRS	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino
PVDF	Fluoruro de povinilideno
RIG-I	Genes inducibles de ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucléico
RNP	Ribonucleoproteínas
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Dodecilsulfato sódico - gel de poliacrilamida
ssDNA	DNA de cadena sencilla
ssRNA	RNA de cadena sencilla
STING	Estimulador de los genes de interferón
TBE	Tris borato EDTA

TBK1	Tirosincinasa 1
TLR	Receptores tipo toll
Tm	Temperatura de desnaturalización
TRAF	Factores adaptadores
tRNA	RNA de transferencia
TRIF	Molécula adaptadora
TRIM	Moléculas de motivos tripartita
TYK2	Tirosina quinasa dos
UC	Uracilo y Citosina
V	Volts

Resumen

RAMÍREZ ROBLES YADIRA ALEJANDRA. **CONSTRUCCIÓN DEL GEN DE INTERFERÓN TIPO I PORCINO PARA SU EXPRESIÓN EN *Escherichia coli* COMO PROTEÍNA RECOMBINANTE.** (BAJO LA DIRECCIÓN DE: DR. JAIME CAMPUZANO GRANADOS DR. JOSÉ ALBERTO CANO BUENDÍA).

Los virus que afectan a los cerdos, han desarrollado estrategias de evasión de la inmunidad generada por las vacunas disponibles en el mercado. Por ello se requiere el desarrollo de nuevas estrategias para el control de las enfermedades virales. Una opción es el uso del interferón porcino recombinante tipo I que ayuda en el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa del hospedero, disminuyendo así la replicación viral. En el presente trabajo se realizó la optimización de las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican para los interferones alfa y beta porcino con un índice de adaptación ≥ 0.3 , para su expresión como proteína recombinante en *Escherichia coli* BL21. La L-arabinosa se utilizó como inductor de la expresión, y se evaluó a diferentes concentraciones y tiempos de inducción, encontrándose que con 0.2% durante ocho horas hay una mejor expresión de ambos interferones.

1. Introducción

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) considera que debido al aumento en el número de habitantes y en el tiempo de la esperanza de vida de las personas, habrá un aumento significativo en la demanda de productos de origen animal en los próximos 20 años en todo el mundo (FAO 2000).

La carne de cerdo ha sido una importante fuente de proteína animal para todos los sectores de la población humana, por lo que tendrá un papel preponderante para satisfacer los crecientes requerimientos. Sin embargo, en la industria porcina, el impacto de las enfermedades virales ocasiona pérdidas económicas que son limitantes para la producción pecuaria.

Muchos de los virus que ocasionan las enfermedades que afectan a los cerdos en el país y en el mundo, han logrado evadir la respuesta inmune generada por las vacunas, por lo que siguen generando pérdidas económicas (Kimman 2009, Renukaradhya 2015 y Wang & Marthaler 2015). Los virus son agentes patógenos con una alta tasa de mutación, lo que ocasiona que una sola vacuna no pueda actuar contra las distintas cepas de un mismo virus. Esta característica de los virus exige de la investigación una constante actualización.

Por otro lado, los tratamientos disponibles en el mercado son costeables únicamente para su uso en animales de alto valor genético y no para todos los animales de una producción.

Lo anterior indica que es necesario que se desarrollen alternativas para el tratamiento de las enfermedades virales que afectan a los cerdos. Una opción es el uso de los interferones recombinantes, que son proteínas desarrolladas a partir del uso de bacterias. Esta estrategia se podría usar en presencia de enfermedades virales, fúngicas y bacterianas (Del Fresno 2013 y Weins 2016).

1.1 Interferón

- **Historia**

El interferón (IFN) fue descubierto por Isaacs y Lindenmann en el año de 1957 cuando estudiaban el fenómeno de interferencia entre virus y células hospedadoras, en donde observaron que un virus inactivado por calor estimulaba la producción de una sustancia que interfería con la replicación de otro virus activo en el mismo tejido (Lindenmann 2007). En poco tiempo se descubrió que los interferones (IFNs) se producían en diferentes especies animales, tejidos y células. Ahora se sabe que son proteínas específicas de especie y se

han encontrado en peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Pestka 2007).

- **Tipos de interferón**

Los IFNs son polipéptidos con secuencias de 180 aminoácidos aproximadamente. Sus pesos moleculares oscilan entre 20 y 34 kDa. Son glucoproteínas que pertenecen al grupo de las citocinas tipo II, que están formadas por cuatro alfa hélices y dos hojas β plegadas (Figura 1; Montaña 2016).

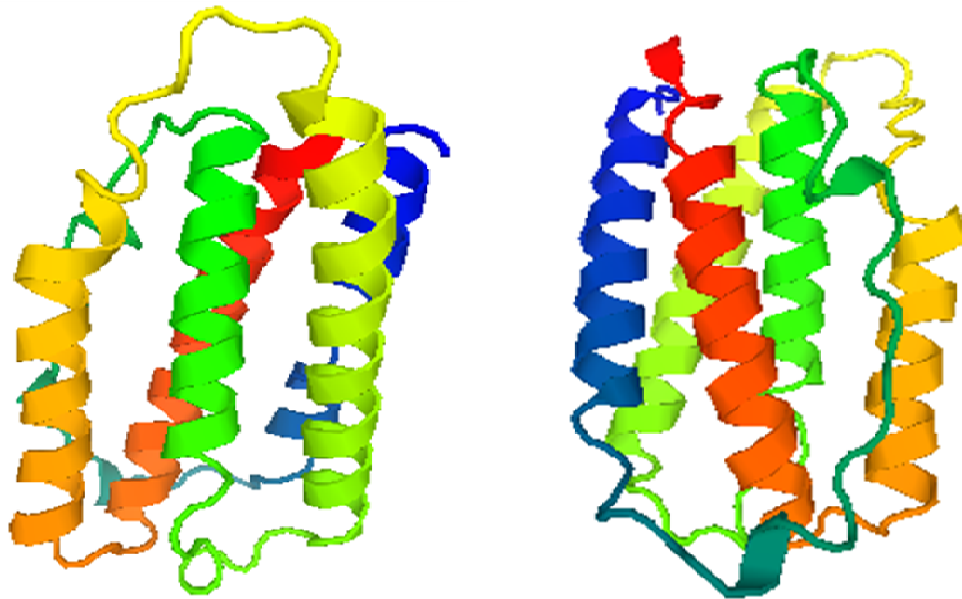


Figura 1. Modelo 3D de los interferones alfa (izquierda) y beta (derecha) porcino; obtenido de ExPASy con los números de acceso Q6VAB8 y Q68IQ4 respectivamente en la base de datos UniProt).

Los IFNs son elementos que actúan en las etapas tempranas de la inmunidad innata y adaptativa. Son secretados por casi todos los tipos de células y se caracterizan por tener una

potente actividad antiviral y antineoplásica, así como por su efecto regulador de las células del sistema inmune (Filella 2002).

En la especie porcina se han identificado los IFNs alfa ($\text{INF}\alpha$; existen diferentes subtipos), beta ($\text{INF}\beta$), omega ($\text{INF}\omega$) y delta ($\text{INF}\delta$), que pertenecen a la familia de los tipo I; y el IFN gama ($\text{INF}\gamma$), que pertenece a la familia de los tipo II (Pestka 2007 y Tizard 2009), sin embargo, este documento se enfoca únicamente los IFNs de tipo I.

Los IFNs ω y δ han sido poco estudiados en la especie porcina, pero se sabe que son reconocidos por el mismo receptor que reconoce al $\text{INF}\alpha$ e $\text{INF}\beta$, y que tienen una actividad muy similar a estos (Günther 1990 y De Weerd 2007). También se han descubierto proteínas que algunos autores denominan parecidas a los interferones (IFN-like proteins), y otros los clasifican como IFNs tipo III. En este grupo de proteínas se encuentran el IFN lambda 1 ($\text{INF}\lambda 1$) o IL-29, $\text{INF}\lambda 2$ o IL-28A, $\text{INF}\lambda 3$ o IL-28B y el $\text{INF}\lambda 4$. Estas citocinas tienen una actividad similar a la que tienen los IFNs de tipo I, sin embargo es más restringida, ya que sus receptores se encuentran únicamente en la superficie de células epiteliales (Pestka 2007 y McNab 2015) y, por otro lado, no están completamente estudiados en la especie porcina.

- **Interferones alfa y beta**

Los IFNs más estudiados son el IFN α y el IFN β (en adelante referidos como IFN α/β) debido a que son de los que predomina su expresión en una célula infectada principalmente por algún agente viral, y bacterias o parásitos en menor medida (McNab 2015).

Los niveles de estas proteínas son detectables cuando su expresión es inducida por virus, sin embargo existen evidencias de su presencia independiente a la presencia de virus y se ha observado que estos niveles basales son importantes para modificar la respuesta celular, y para la producción de otras citocinas (De la Fuente 1996 y Takaoka 2006).

Los IFN α/β son expresados en todas las células, pero el IFN α es expresado predominantemente por células dendríticas plasmocitoides (pCDs) y leucocitos; y el IFN β por fibroblastos (Tizard 2009).

Dentro de los efectos de los IFNs se encuentran la expresión de genes de las células asesinas naturales (NK) para mediar la citotoxicidad por medio de otras citocinas, la maduración de macrófagos y células dendríticas (DCs), que son células esenciales para la respuesta inmune innata y adaptativa. También activan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; Takaoka 2006). Por otro lado, se sabe del efecto

negativo que estas citocinas tienen en el crecimiento en células tumorales (Duun 2005).

A pesar de las numerosas similitudes que presentan ambos IFNs en su forma de activación, existen diferencias estructurales en ambas proteínas que hacen que la interacción con su receptor sea diferente, hecho que permite la activación de diversas moléculas además de la vía clásica de activación de los IFNs. Estas diferencias en la respuesta generada por los IFN α/β ha sido observada en experimentos en donde se desafía a un hospedador con el mismo microorganismo y se trata con los IFN α/β de manera independiente (Bodgan 2000 y De Weerd 2007).

1.1.1 Expresión del interferón

La expresión de los IFNs tipo I es estimulada por una serie de interacciones entre sustratos y receptores que tienen lugar en diferentes partes de las células (McNab 2015).

- **Patrones moleculares asociados a patógenos y Receptores tipo Toll (PAMPs y TLRs)**

Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son los sustratos que estimulan a los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y generan señalizaciones para la producción de los IFN α/β . Dentro de éstos PRRs se encuentran los receptores tipo toll (TLR) que activan

diferentes rutas para la expresión de los IFN α/β (McNab 2015). El TLR4, que reconoce el lipopolisacárido de bacterias, es el inductor extracelular de interferón tipo I más potente. Sin embargo, también existen receptores intracelulares que se encuentran ligados específicamente a la producción de éstas citocinas. Por ejemplo, los receptores endosomales TLR3, que reconocen ARN de doble cadena (dsRNA), es considerado el principal inductor de la producción de IFN α/β ; los TLR7, que reconocen ARN de cadena sencilla (ssRNA) con secuencias ricas en GU; y los TLR9, que se activan con fragmentos CpG sin metilar de cadenas de ADN (Biron 2002). Las glicoproteínas de las envolturas virales y DNA bacteriano pueden ser también potentes inductores (Bodgan 2000 y Kindler 2016).

Existen otros PRRs que se encuentran en el citoplasma de la célula, que también se encuentran directamente relacionados con la expresión de los IFN α/β . Algunos de ellos son RIG-I, que reconoce cadenas pequeñas a ssRNA con secuencias ricas en UC; MDA5, que reconoce ssRNA de sentido negativo; NOD1, NOD2, y cGAS que reconocen ácidos nucleicos virales (Fang 2016 y McNab 2015).

- **Factores reguladores del interferón (IRFs)**

Posterior a la estimulación de los PRRs, se estimulan los factores reguladores del interferón (IRF), que son proteínas que activan la transcripción de los genes que codifican para los IFN α/β . Aunque que hay varios IRF que tienen esta función (como los IRF1, IRF5 e IRF8), los que se encuentran generalmente involucrados son los IRF3 e IRF7, que al unirse al co-activador de la transcripción CREB forman el complejo IRF-CBP/p300, que es necesario para su traslocación al núcleo y la posterior estimulación de la expresión de los IFNs tipo I (McNab 2015 y Fang 2016). En la especie porcina se ha encontrado que el IRF1 tiene un papel fundamental para proteger contra agentes virales (Li 2015).

- **Genes inducibles del ácido retinoico y proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma (RIG Y MDA5)**

Cuando RIG-I y MDA5 entran en contacto con DNA citoplasmático extraño, activan la proteína adaptadora de la señalización mitocondrial antiviral (MAVS), que a través de los adaptadores TRAF 2, 3, 5 y 6 activan las cinasas TBK1, IKK α , IKK β e IKK ϵ que fosforilan al estimulador de los genes de IFN (STING), que es otro potente activador de los genes de los IFN α/β , además del IRF3 y el NF κ B (McNab 2015). El STING puede activarse también a través de la unión de dinucleótidos

bacterianos cíclicos o ADN a la sintetasa cíclica GMP-AMP (cGAS) que se encuentra en el citoplasma que activa la cGAMP, y promueve la actividad del STING (Weins 2016; figura 2a).

- **Moléculas adaptadoras**

Dependiendo del TLR que se active, es la ruta que desencadena para la producción de los IFNs. Si el TLR3 reconoce algún PAMP, se activan las cinasas TBK1 e IKK ϵ a través de las proteínas adaptadoras TRIF y TRAF, que fosforilan el IRF3 (McNab 2015 y Doly 1998). Si el que se activa es el TLR7, se activa la cinasa IKK α a través de las moléculas adaptadoras MyD88 y TRAF3, que fosforilan el IRF7. Además, por esta misma ruta, pero con el adaptador TRAF6 puede ser activado el factor nuclear NF- κ B, que junto con los IRFs son translocados al núcleo para activar la expresión de los genes de los IFN α/β (Wang R 2014; figura 2 b).

1.1.2 Mecanismo de activación

Posterior a su síntesis, los IFN α/β son liberados para unirse a su receptor en la misma célula que lo produjo y en las células vecinas (Fang 2016). El receptor para los IFN tipo I (miembro de la familia de receptores de la citocinas helicoides tipo II) es un complejo de heterodímeros compuesto

por la cadena α (IFAR1) y la cadena β (IFNAR2; Schneider 2014).

La interacción de los IFN α/β con su receptor INFAR1-IFAR2 resulta en la activación de los IRF3 e IRF7, que generan la producción de más IFN y la posterior activación de las diversas rutas que generan los efectos de estos IFNs tipo I.

- **Janus cinansa - señal activadora de la traducción (JAK/STAT)**

En la vía clásica de activación del IFN, se encuentran involucradas la Janus cinansa y la señal activadora de la traducción, mejor conocidas como JAK/STAT (Bekisz 2004).

El receptor INFAR1-IFAR2, en su porción citoplasmática, se encuentran asociado de manera no covalentemente con la tirosincinasa TYK2 y JAK1, respectivamente, que al ser estimuladas fosforilan el complejo heterodimérico STAT1-STAT2-IRF9 que recibe el nombre de factor estimulador de los genes de interferón 3 (ISGF3). El complejo se une a los elementos estimulados por IFN (ISRE), que son secuencias de DNA que promueven la expresión de los genes estimulados por IFN (ISGs); éstos ISGs son los que generan la actividad antiviral a través del IFN (Barber 2001 y McNab 2015).

Por otro lado, se sabe que el primer IRF en activarse es el IRF3, que estimula principalmente la síntesis de IFN β ; este

activa la vía Jak-STAT, y además fosforila el IRF7 que genera la activación de la expresión del IFN α . Este proceso se repite con cada molécula de IFN producida, generando así, más interferón (Pitha 2007).

- **Otras vías**

Además la vía clásica JAK-STAT, los IFN α/β activan otras vías como la de los homodímeros de STAT1, que son más comúnmente asociados a la señalización por IFN γ . STAT3, STAT4, STAT5A y STAT5B son vías que se asocian a la activación por otras citocinas, sin embargo, también pueden ser activadas por los IFN α/β y generar la expresión de ISGs. Esta amplia variedad de rutas explica la diversidad de efectos que tienen estas citocinas (McNab 2015; figura 2 c).

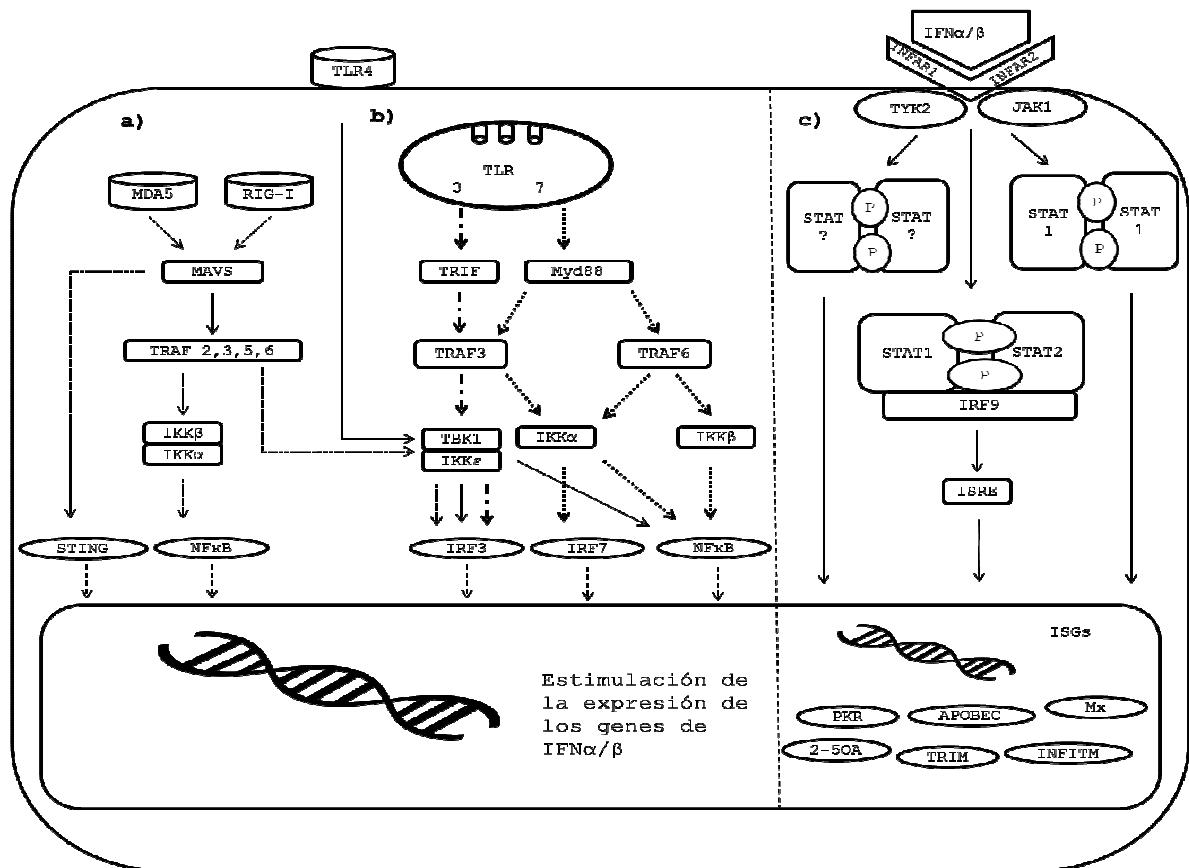


Figura 2. Expresión y mecanismo de activación de los interferones alfa y beta (Modificado de Pitha 2007, McNab 2015 y Kindler 2016). La expresión de los IFN α/β se da cuando a) MDA5 y RIG-I entran en contacto con DNA extraño; a partir de este evento se genera una cascada de señalización que involucra a las moléculas MAVS, TRAF 2, 3, 5 y 6, e IKK α y β , que activan a STING y NF κ B; o cuando b) los TLR son estimulados y a través de TRIF y MyD88 activan TRAF 3 Y 6 para fosforilar las cinasas que activan y translocan al núcleo IRF3, IRF7 y NF κ B para activar los genes que codifican para los IFNs. Una vez producido el IFN, entra en contacto con INFAR1-INFAR2 de manera autócrina y parácrina para activar las rutas Jak/STAT y otras que generan la expresión de los ISGs.

1.1.3 Actividad antiviral a través de los genes estimulados por interferón (ISGs)

Se han descrito alrededor de cuarenta ISGs con mecanismos de acción antiviral (Kindler 2016). A continuación se describen sólo algunos de ellos.

- **2'-5'Oligoadenilato sintetasa**

Las oligoadenilato sintetetasas son una familia de enzimas que se activan al unirse a ARN de doble cadena (dsRNA), y catalizan la unión 2'-5' oligo-adenilato (2-5A) de un ATP donador (Sánchez 2016). La única función que se le conoce es la activación de la RNasaL latente, una endoribonucleasa que se encuentra en todas las células de mamíferos y que sirve para regular la cantidad de mRNA mitocondrial. Cuando el 2-5A activa la RNasaL, ésta escinde el ssRNA tanto viral como de la misma célula, evitando así la replicación del material genético (Banerjee 2016). Además la RNasaL activa a la caspasa 1 a través del inflamosoma NLRP3, que genera la apoptosis celular (Drappier 2015).

- **Proteína cinasa R (PKR)**

La proteína cinasa R (PKR) es un ISG que tiene dos dominios: un sitio de unión a dsRNA N-terminal, y un sitio catalítico C-terminal. A pesar de que su expresión es inducida por el IFN, también es expresada en niveles basales en la mayoría de

las células como un monómero inactivo, que es activado principalmente por la unión con dsRNA, que genera la dimerización y autofosforilación (Husain 2015). Una vez activada, se catalizan algunos sustratos proteicos, el más descrito es la subunidad 2α del factor iniciador de traducción de células eucariontes (eIF2 α), que al ser fosforilado no puede cumplir su función e inhibe la traducción de proteínas (Pham 2016). Además, esta ISG genera apoptosis al activar la caspasa 8 y autofagia a través del factor eIF2 α que activa la proteína asociada a microtúbulos LC3 (Yim 2016). Por otro lado, activa el IRF3, el NF- κ B y el factor de activación de la transcripción 2 (ATF2), que estimulan la expresión de los genes de los IFN α/β (Kang 2012).

- **Proteínas de resistencia a mixovirus (Mx)**

Las proteínas de resistencia a mixovirus (Mx) pertenecen a la superfamilia de las trifosfatasas de la guanosina (GTPasas). Las más descritas son Mx1 (conocida también como MxA) y la Mx2 (Arighi 2002). La Mx1 tiene actividad contra virus ARN y ADN (Haller 1998) ya que hidroliza los complejos formados por ribonucleoproteínas (RNP)- ARN/ADN, que le dan estabilidad al material genético (Shi 2015). Además, reconoce la nucleocápside y mantiene a la partícula viral alejada del núcleo e impide su libre tránsito por la célula (Zürcher 1992

y Haller 2007); a diferencia de la Mx2, que sólo tiene actividad contra algunos virus ARN, ya que impide la acumulación e integración del ADN complementario (cDNA) viral al cromosoma del huésped (Goujon 2013). En el cerdo, la Mx2 ha mostrado tener efecto inhibitor frente al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) en células de riñón de mono Marc-145 (Wang 2015).

- **Adenosindeaminasa (ADAR)**

La familia de las adenosin deaminasas (ADAR) actúan en el dsARN provocando un efecto mutagénico, ya que al unirse a las adenosinas las deaminan y las convierten en inosinas, que son reconocidas como guanosinas. Por lo tanto la deaminación altera la secuencia de nucleótidos y, por lo tanto, la secuencia de aminoácidos (Bodgan 2000 y Gélinas 2011).

- **Proteínas transmembranales inducidas por interferón (IFITMs)**

Las proteínas transmembranales inducidas por IFN (IFITMs), se encuentran en la membrana celular y de endosomas (Lu 2011). Tienen diferentes funciones, sin embargo las isoformas con actividad antiviral son los IFITM 1, 2 y 3 (Wilkins 2016), ya que interfieren con la entrada por endocitosis y salida por exocitosis de una gran variedad de virus envueltos y algunos no envueltos a través de mecanismos aún no definidos (Muñoz-Moreno 2016 y Weston 2016). Dentro de los IFITMs se encuentra

también la teterina, que es una proteína que inhibe la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) por mecanismos tampoco conocidos (Montal 2009 y Wang X 2014).

- **Apolipoproteínas (APOBEC)**

La familia de las enzimas editoras de la apolipoproteína B mediante ARNm semejante a polipéptido catalítico (APOBEC), son desaminasas de la citidina dependientes de zinc (Dörrschuck 2011). Estas proteínas generan diferentes efectos en el material genético, sin embargo el más conocido es que cuando se activan, desaminan las citidinas de las moléculas de ssDNA y ssRNA que se forman durante la transcripción de proteínas (Bouzidi 2016) y son reconocidas como uridinas, por lo que se genera un efecto mutagénico (Salter 2016).

- **Moléculas de motivos tripartita (TRIM)**

La familia de moléculas de motivos tripartita (TRIM), restringe la infección por retrovirus al reconocer la cápside viral cuando ésta ingresa a la célula (Si 2006), la desintegra y expone el material genético viral de manera prematura en el citoplasma en donde se encuentran otras enzimas que lo degradan (Da Silva 2016). Por otro lado, se une al cDNA impidiendo la replicación del genoma viral. Tienen actividad contra virus ADN y ARN (Kahle 2015). Además interactúan con la IKK ϵ y NF- κ B, que inducen la expresión de ISGs dependientes del IFN (Huang 2016).

Otro ISG de importancia contra el virus del PRRS, es la viperina, proteína a la que se le atribuye la actividad *in vitro* de impedir la entrada y salida del virus en células Marc-145 (Fang 2016).

La gran variedad de efectos antivirales que ejercen los ISGs en las diferentes etapas de la infección viral, permite entender el mecanismo por el que los IFNs protegen a los individuos frente a diversos patógenos. Sin embargo, los ISGs no son la única forma de protección por medio de estas citocinas (McNab 2015).

1.1.4 Efectos de los interferones alfa y beta sobre células del sistema inmune

Además de limitar la replicación y liberación de los virus a través de los mecanismos ejercidos por los ISGs, se han reconocido varios efectos de los IFN α/β sobre ciertas células del sistema inmune (McNab 2015).

- **Células asesinas naturales**

En el caso de las células NK, el efecto de estas citocinas es estimular su diferenciación a partir de los progenitores linfoides comunes, su maduración, su actividad citotóxica y como célula presentadora de antígenos (APC), además de la producción de algunas citocinas pro-inflamatorias (Guan 2014).

Esta activación puede ser directamente al estimular el INFAR, suceso a partir del que se fosforilan los STAT4 y STAT1, que son rutas relacionadas con la producción de IFN γ . Sin embargo, la activación puede potencializarse de manera indirecta cuando las células NK entran en contacto con las interleucinas 12 (IL12), IL15 e IL18 producidas por DCs activadas (Stackaruk 2013).

El mecanismo de acción de las células NK se desarrolla directamente en las células infectadas a través de la acción de perforinas y granzimas que activan la ruta de las caspasas generando apoptosis. Por otro lado, las células NK pueden producir citocinas antivirales como el IFN γ (Paolini 2015).

- **Macrófagos**

En macrófagos, los IFN α/β pueden estimular directamente su maduración para activar el mecanismo de resistencia por óxido nítrico (NO). Este sistema es eficiente contra partículas virales y otros patógenos intracelulares no virales. El NO es un gas soluble en agua y lípidos que reacciona con oxígeno y genera metabolitos capaces de modificar componentes esenciales para la expresión y la replicación viral (Biron 1998, Gonzalez 2002).

- **Células dendríticas**

Las DCs, además de ser las principales productoras de los IFNs, presentan en su superficie el INFAR, por lo que tienen

un papel importante en el desarrollo de la actividad de estas citocinas (Zuniga 2007 y Züst 2013).

Cuando los IFN α/β estimulan a las DCs, estas migran a órganos linfoides, y su actividad como APC también se ve favorecida debido a la mayor expresión de moléculas co-estimuladoras CD83, CD40, CD80 y CD86, además del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I y tipo II. Esta característica estimula la proliferación de células T CD8 y CD4. Adicionalmente a estos efectos, se produce IL-12 (Bodgan 2000 y Le Bon 2002), que es una citocina inflamatoria que favorece la respuesta inmune adquirida de diferentes formas. Por un lado estimula la actividad citotóxica de las células NK, células T CD8 y CD4; y por otro lado, favorece la producción de IFN γ a través de la fosforilación de STAT4 en las células NK y Th1. Se han relacionado diversos efectos antivirales de los IFNs a esta citocina (Vacaflares 2016).

- **Linfocitos T CD8**

Los IFN α/β favorecen la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8, la producción de otras citocinas por parte de estos linfocitos, la generación de células de memoria y el aumento en su tiempo de vida media (Miyatake 2006 y Rizza 2014).

- **Linfocitos T CD4**

Por otro lado, la aumentada actividad como APC de las células NK, DCs y macrófagos estimulada por estos IFNs tipo I ayuda a la diferenciación de los linfocitos T CD4 vírgenes a células Th1 gracias la modulación de las moléculas co-estimuladoras; además de promover su expansión clonal a través de la presentación cruzada de antígenos (Harvenar-Daughton 2006).

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que la respuesta Th1 se ve favorecida debido no sólo a la aumentada presentación de antígenos, sino también debido a la acción del IFN γ , de la IL12 y los mismos IFN α/β (Vacaflares 2016).

Las células Th1 son las principales productoras de IFN γ , que funge como cofactor redundante para la diferenciación de estas mismas células, ya que estimula la expresión de receptores para la IL12 (IL12R) (Sinigaglia 1999).

- **Linfocitos B**

Se ha demostrado que los IFN α/β estimulan la diferenciación de células B a células plasmáticas, que son las responsables de producir anticuerpos neutralizantes específicos contra diferentes patógenos virales. Esta producción de anticuerpos está caracterizada por la presencia de diferentes isoformas y subclases de las inmunoglobulinas (Ig). Por ejemplo, se ha detectado la presencia IgG2a, que ayuda a la fijación del

complemento, al mismo tiempo que IgA dirigida al mismo patógeno (Sinigaglia 1999 y Tovey 2008).

En diversos estudios se ha observado que la respuesta primaria humoral estimulada por los IFN α/β , puede proteger eficientemente al hospedero, además de que el tiempo de respuesta se prolonga por varios meses al igual que el tiempo de vida de las células de memoria (Le Bon 2001 y Prchal 2009).

1.2 Interferones recombinantes

Los interferones recombinantes son aquellos obtenidos de un sistema de expresión diferente al que pertenecen. Se han utilizado sistemas como por ejemplo: levaduras (Hao 2006), virus (Wang 2009) y bacterias (Li 2010).

• Antecedentes

En los años ochenta se utilizaron leucocitos humanos cultivados y estimulados con virus de Newcastle o virus de Sendai como fuente principal de IFN. Los ensayos se realizaban con el extracto leucocitario total, con el que se observaban efectos antivirales que no podían atribuirse específicamente al IFN (Cantell 1981). En el área veterinaria se presentaba la misma situación en el caso del IFN porcino (Díaz de Arce 1991).

Posteriormente, la primera purificación del IFN se realizó por medio de cromatografía líquida de alta afinidad (HPLC), técnica que con el paso del tiempo se fue modificando y mejorando, y que permitió la purificación de la cantidad suficiente de IFN para conocer sus características físicas, químicas, biológicas e inmunológicas (Pitha 2007).

Debido a su potencial antiviral, el IFN purificado se utilizaba para ensayos de restricción viral, sin embargo, la estimulación de leucocitos no era una metodología eficiente para obtener la cantidad necesaria de IFN que permitiera realizar ensayos clínicos. No fue sino hasta la década de los ochenta que el uso de la biotecnología permitió la producción y purificación de cantidades suficientes de IFN recombinante (Young 1990).

El poder contar con grandes cantidades de estas citocinas, ha permitido el estudio de sus efectos en contra de diferentes enfermedades tanto en humanos como en animales, así como la determinación de las dosis en las que se produce el efecto esperado. A la par de estos estudios, se ha encontrado que los IFNs ejercen diferentes efectos en el hospedero según el agente patógeno de que se trate, vía de administración y dosis; por ello, es pertinente resaltar la importancia de realizar minuciosas investigaciones al respecto (Babiuk 1991).

El primer IFN recombinante humano en ser evaluado como tratamiento fue el IFN α , que fue aprobado para su uso contra la leucemia de células pilosas y el sarcoma de Kaposi. Desde entonces, se han desarrollado investigaciones que han permitido su uso contra gran variedad de cánceres y enfermedades virales como la hepatitis B crónica, hepatitis C, herpes labial y genital, papilomatosis laríngea, esclerosis múltiple, y melanoma, entre otras (Pestka 2007 y Schneider 2014). Por otro lado se han observado los efectos que tienen al disminuir la hipertensión pulmonar de los pacientes tratados, resaltando así, algunos beneficios adicionales de su uso en humanos (Bauer 2014).

- **Medicina veterinaria**

En medicina veterinaria el único interferón recombinante disponible en el mercado es el IFN ω felino, que se usa como tratamiento contra la inmunodeficiencia viral y la peritonitis infecciosa felina, enfermedades causadas por virus de la familia Coronaviridae. En ambos casos, se ha observado que el tiempo de vida de los animales infectados aumenta y la presentación de signos clínicos disminuye. Por otro lado, se ha sometido a evaluación por las vías de administración oral y parenteral, obteniéndose resultados similares en ambos casos (Ritz 2007 y Gil 2014).

En medicina veterinaria se han hecho investigaciones de los efectos de éstas citocinas en las diferentes especies animales domésticas contra gran variedad de patógenos.

Por ejemplo, en el perro se ha evaluado el efecto del IFN ω felino recombinante en el tratamiento de la dermatitis atópica, en donde se obtuvo como resultado la disminución de los signos clínicos de la enfermedad (Carlotti 2009).

Por otro lado se ha propuesto el uso del IFN γ ovino recombinante como herramienta de diagnóstico de *Brucella melitensis* (Perez-Sancho 2014); mientras que el IFN γ bovino se ha evaluado contra *Mycobacterium tuberculosis*, y se ha propuesto su uso como herramienta diagnóstica de esta misma bacteria (Xu 2015 y Sinclair 2016); también existen evaluaciones de este IFN en el caballo (Bai 2010). El IFN τ bovino recombinante es investigado por sus efectos en reproducción en el bovino y en el búfalo (Bao 2014 y Saugandhika 2015), además de su aplicación contra algunas enfermedades virales (Sei-Ichi 2015).

El estudio de los IFNs en la especie porcina no es la excepción. Algunos grupos de investigación han utilizado *Escherichia coli* (Zhou 2011), *Pichia pastoris* (Ding 2013) y *Lactobacillus casei* (Ma 2014) como sistemas de expresión del IFN porcino recombinante.

Estos se han evaluado contra gran variedad de virus alrededor del mundo, y se ha demostrado que ayudan al desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa además de que su uso disminuye la morbilidad y mortalidad, presentación de signos clínicos y su severidad. En Francia se ha evaluado contra el virus de la pseudorabia porcina (Pol 1991) y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (Sang 2011), en Suiza contra el virus de la estomatitis vesicular (Horisberger 1992), en Canadá contra el virus de la gastroenteritis transmisible (Jordan 1995), en Estados Unidos se ha evaluado contra el virus de la fiebre aftosa (Diaz-San Segundo 2010 y Dias 2011), y en varios países contra el virus de la influenza porcina (Zhou 2011).

Por otro lado, los interferones tipo I se han administrado junto con vacunas y se ha observado un mejor desarrollo de la inmunidad adaptativa celular y humoral con respecto a la administración únicamente de la vacuna contra diferentes patógenos virales (Du 2012, Wu 2013, Zhang 2013 y Kim 2015).

- **Problemática en la producción de proteínas recombinantes**

Uno de los grandes retos para la tecnología de proteínas recombinantes es que la expresión de estas se dificulta fuera de su contexto original. Esto debido a que la secuencia de los genes de interés pueden contener codones que son de uso

raro en el sistema de expresión ya que provienen de organismos completamente diferentes, y que pueden fungir como elementos que limitan la expresión proteica (Gustafsson 2004).

El término *codon usage bias* se refiere al uso de codones de RNAm que los ribosomas de un organismo reconocen con mayor frecuencia. Cada aminoácido puede estar codificado por varios codones sinónimos alternativos, la frecuencia del uso de cada uno varía entre organismos y determina el nivel de expresión. Sin embargo, el uso de codones también está relacionado con el tipo de RNA de transferencia (RNAt) disponible en el organismo y que es empleado en el proceso de traducción de proteínas (Narum 2001).

La expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, que es un sistema de expresión ampliamente usado, se ve afectada cuando el *codon usage bias* es diferente al suyo, y se pueden generar productos tóxicos para la bacteria, inestabilidad del mRNA, ausencia de cambios postraduccionales y saturación del sistema de expresión. Por otro lado, la deficiencia de tRNA que se acople al mRNA deriva en falta de aminoácidos para la síntesis proteica y, por lo tanto, genera polipéptidos truncos y disminución de la calidad y niveles de la expresión (Rosano 2009, Mirzahoseini 2011 y García 2013).

1.2.1 Optimización de secuencias

La optimización de secuencias es la modificación de los codones del gen de interés al uso de codones más óptimo para el sistema de expresión, sin alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína. Para ello se utiliza la información de la secuencia de nucleótidos del gen o la secuencia de aminoácidos de la proteína (Puigbo 2007).

Se han desarrollado diversas formas de medir el uso de codones, entre los que se encuentra el índice de uso de codones (CAI), que ha sido empleado en muchos experimentos relacionados con expresión de proteínas recombinantes y vacunas génicas. El CAI es un valor (de 0 a 1) que se asigna a los codones de ADN y ARN, y cuantifica la similitud del uso de codón entre un gen y otro de referencia en las diferentes especies. Se le asigna valor de 0 a los codones de uso poco frecuente y valor de 1 a los de uso más frecuente. Este valor está relacionado con la cantidad de RNAt disponible en el sistema y determina la frecuencia de uso de los codones (Puigbo 2008 y Lee 2010).

La optimización de las secuencias utilizando diferentes CAI, ha resultado en una mayor expresión de proteínas, en las que además se ha observado que las proteínas recombinantes conservan su actividad biológica y las vacunas génicas logran

desarrollar inmunidad adaptativa en los animales inmunizados (Narum 2001, Dobaño 2009, Liu 2014, Kato 2015 y Ranjbar 2015).

2. Justificación

Los virus que afectan a los cerdos han desarrollado estrategias de evasión de la respuesta inmune que obligan al desarrollo de otras estrategias de control. El uso de los interferones porcinos tipo I es una alternativa que ofrece las ventajas de no ser específicos en contra de un solo virus, pueden limitar la replicación viral y ayudar en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa celular y humoral. Por otro lado, en la actualidad se busca el desarrollo de vacunas multicomponentes en las que puede incluirse el uso de los interferones para potencializar el desarrollo de la respuesta inmune. Sin embargo, su expresión como proteínas recombinantes presenta ciertas limitantes. Por lo que se propone el uso de secuencias de nucleótidos optimizadas, que además de permitir una mejor expresión de los interferones recombinantes, puede ayudar a reducir los costos de su producción.

3. Hipótesis

La optimización de secuencia del gen de interferón porcino tipo I no afectará su expresión como proteína recombinante en *Escherichia coli* BL21.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Obtener la expresión de los interferones porcinos tipo I alfa y beta como proteínas recombinantes en *Escherichia coli* BL21 utilizando secuencias optimizadas.

4.2 Objetivos particulares

- Optimizar la secuencia de interferón tipo I porcino.
- Construir el gen del interferón tipo I porcino.
- Clonar el gen de Interferón tipo I porcino en el vector de expresión pBAD Myc-His A.
- Evaluar la expresión del gen de interferón tipo I porcino en *Escherichia coli* BL21.

5. Materiales y métodos

5.1 Análisis de las secuencias

Las secuencias de los genes de los IFN α/β porcino se obtuvieron de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con los números de acceso KF414740.1 y AY687281.1, respectivamente.

Se realizó revisión de las secuencias para verificar la presencia de codones raros para *Escherichia coli*, sitios de restricción de las enzimas usadas en este trabajo (NcoI y ApaI; #ER0571 y #ER1411, Thermo Scientific) así como el porcentaje de guanina citosina (%GC) que los compone.

5.2 Optimización de las secuencias y construcción de los genes de interferón alfa y beta porcino

La optimización de las secuencias se realizó con el programa *Codon Optimizer* de uso libre (The Biodesign Institute, Universidad de Arizona, USA). Los codones raros fueron sustituidos usando un CAI con valor ≥ 0.3 para *Escherichia coli* (Puigbo 2007).

Así mismo, para facilitar el reconocimiento del codón de inicio de la transcripción (ATG) se agregó la secuencia Kozak (5' ACCATGG 3'; Cammack 2006) en ambos genes; para la clonación en el plásmido de expresión se agregaron los sitios de restricción de las enzimas NcoI (5' C|CATGG 3') en el extremo 5', y ApaI (5' GGGCC|C 3') en el extremo 3', a la vez que se eliminaron los sitios localizados dentro de la secuencia para estas mismas enzimas.

El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo por medio del programa *DNABuilder* de uso libre del Instituto de Biodiseño de la Universidad del Estado de Arizona (<http://www.innovationsinmedicine.org/software/DNABuilder/>), del que también se obtuvo el protocolo de ensamblaje y amplificación.

Los oligonucleótidos diseñados se normalizaron en base $T_m = 55 \pm 1^\circ\text{C}$ usando la fórmula de Meinckotg and Wahl ($T_m = 61 + 0.41 \times (\%G + \%C) - 675/n$; Borovkov 2010).

La construcción de los genes se realizó en tres reacciones de PCR usando la enzima PrimeSTAR Max DNA Polimerase (#R045A, Takara); se usaron las constantes descritas en el Cuadro 1, usando el termociclador Aektik Thermo Cyclor (#TCA0096, Thermo Scientific).

Cuadro 1. Constantes de ensamblaje y amplificación de los genes de interferón alfa y beta porcino.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	1:00	1
Desnaturalización	94	1:00	30
Alineamiento	55	1:30	
Elongación	72	1:10	
Elongación final	72	1:00	1

En las primeras dos reacciones de ensamblaje, se utilizaron mezclas de oligonucleótidos con una concentración de 25 μ M. Y en la tercera reacción, que es de amplificación, se utilizaron las segundas reacciones de ensamblaje (sin cuantificación del DNA) y los oligonucleótidos 1aFw y 20aRv del gen de IFN α y el 1bFw y 16bRv del gen de INF β (Anexo 1).

- **Electroforesis**

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador tris borato-EDTA (TBE) a 80V por una hora. El gel se tiñó en bromuro de etidio (#1558-011, Invitrogen) al

0.05% y se observó en un fotodocumentador. Se utilizó el marcador 1kb Plus DNA Ladder (#10787-018, Invitrogen).

- **Purificación de bandas del gel de agarosa**

Una vez obtenidas las bandas esperadas de 586 y 591 pb, se cortaron del gel de agarosa y se purificaron usando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (#A9281, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.3 Clonación en el vector cloneJET

Los genes de los IFN α/β amplificados y purificados fueron clonados en el vector para productos de PCR CloneJET (#K1231, Thermo Scientific). Este procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El vector CloneJET tiene el gen de resistencia a la ampicilina para la selección de las colonias transformadas.

Las clonaciones de los IFN α/β en el vector CloneJET, se usaron para transformar las bacterias electrocompetentes de *E. coli* One Shot Top 10 (#C404003, Invitrogen) mediante electroporación siguiendo el procedimiento que a continuación se describe (Sambrook 2001):

- **Transformación**

1. Todo el material utilizado en este procedimiento se mantuvo en hielo. Se añadieron 5 μ L de la reacción de ligación al vial con las bacterias, se homogenizó y se incubó en hielo por cinco minutos.
2. La mezcla de bacterias con el ADN se colocó en las cubetas de electroporación *E. coli* Pulser Cuvette (#165-2086, Bio-Rad) de 0.2 cm. Se dio un pulso en el aparato de electroporación MicroPulser (#165-2100, Bio-Rad) de 2.5 kV por 6 milisegundos. Inmediatamente se añadió medio SOC y se colocaron en un tubo de polipropileno de 1 ml y se incubaron durante una hora a 37°C en agitación a 225 rpm.
3. Las bacterias se plaquearon en agar Luria Bertani (LB) que contiene 150 μ g/ml de ampicilina (#A-301-5, Gold Biotechnology) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

- **PCR de colonia**

Se realizó PCR de colonia para verificar la presencia de los genes de interés en las colonias crecidas. Para ello se tomó una muestra de la colonia y se colocó en un microtubo junto con la enzima GoTaq Colorless Mater Mix (#M7132, Promega), y

los iniciadores se usaron los oligonucleótidos 1aFw y 20aRv para el gen del IFN α , y los oligonucleótidos 1bFw y 16bRv para el gen del IFN β . Las constantes utilizadas en el termociclador se describen en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Constantes de PCR de colonia.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	10:00	1
Desnaturalización	94	1:00	30
Alineamiento	55	1:30	
Elongación	72	1:10	
Elongación final	72	5:00	1

- **Purificación de DNA plasmídico**

La colonias que resultaron positivas a la presencia de los genes se amplificaron en 5 mL de medio LB líquido con 150 μ g/mL de ampicilina y se realizó extracción y purificación del ADN plasmídico con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (#A1460, Promega).

- **Doble digestión**

Se realizó doble digestión del ADN plasmídico obtenido usando las enzimas NcoI y ApaI. De cada una de las enzimas se utilizaron 10 U/ μ g de DNA en amortiguador tango 1X que se incubó a 37°C durante una hora.

Posteriormente, se realizó la electroforesis y las bandas correspondientes a los genes de interés, fueron purificadas del gel de agarosa como se describe en el apartado 5.2.

5.4 Digestión y subclonación en el vector de expresión pBAD Myc/His A

El vector pBAD Myc/His A (#V440-01, Invitrogen) es un vector de expresión para células procariontes que contiene en su genoma el promotor araBAD, el gen de resistencia a ampicilina y una región C-terminal de polihistidinas.

- **Digestión del vector**

El vector fue igualmente digerido con el procedimiento descrito en el apartado 5.3. Los genes obtenidos del procedimiento anterior, se emplearon para ser sub-clonados en el vector.

- **Subclonación**

Para la subclonación se emplearon 5 U de la ligasa T4 DNA Ligase (#EL001, Thermo Scientific), 100 ng del vector linearizado y 43 ng del inserto, cantidad que corresponde a una relación 3:1 del gen con respecto al vector, que se calculó con la siguiente fórmula: $\text{ng inserto} = 3 \left(\frac{\text{tamaño inserto pb}}{\text{tamaño vector pb}} \right) (\text{vector ng})$. La reacción se incubó durante 12 horas a 16°C.

Posteriormente se tomaron 5 µL de la reacción para transformar las bacterias *E. coli* Top 10 electrocompetentes. A las colonias obtenidas se les realizó PCR de colonia para comprobar la presencia del gen, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% y las colonias que resultaron positivas a la presencia de los genes se amplificaron y purificaron como se describe en los apartados 5.2 y 5.3.

5.5 Secuenciación de las construcciones y expresión de las proteínas

Se transformó la cepa electrocompetente *E. coli* One Shot BL21 Star DE3 (#44-0049, Invitrogen) con las purificaciones obtenidas del procedimiento anterior. Esta cepa permite una mayor estabilidad del RNA mensajero debido a la mutación del

gen de la RNAsa E, además de que la producción de proteínas se ve favorecida por la ausencia de proteasas debido a la presencia de los genes *OmpT* e *Ion*, lo que reduce la degradación de proteínas recombinantes (Hernández 2014).

Para confirmar la presencia de los genes de los INF α/β en las colonias de *E. coli* BL21, se realizó una PCR de colonia. Las colonias positivas a la presencia del gen se amplificaron y purificaron como se describe en el apartado 5.3.

- **Secuenciación**

El ADN obtenido de ambas construcciones se envió al Instituto de Biotecnología para realizar la secuenciación. Para ello, se utilizaron los iniciadores pBAD forward y pBAD reverse. Se analizó la similitud con las secuencias diseñadas a través de la versión demostrativa del programa SnapGene.

- **Inducción de la expresión**

Una vez identificadas las clonas perfectas, se determinó la concentración del inductor L-arabinosa que genera una mayor expresión de la proteína. El procedimiento se describe a continuación:

1. En medio LB se incubaron las *E. coli* BL21 sin transformar, y en medio LB con 150 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina

las transformaciones durante toda la noche a 37°C/225 rpm.

2. En medio LB con ampicilina se realizó una dilución 1:100 con el cultivo fresco de toda la noche. Se incubaron hasta alcanzar una densidad óptica (OD)₆₀₀~0.5 medida con el equipo Biophotometer D30 de Eppendorf.

3. Se prepararon diluciones del inductor L-arabinosa (#A3256-25G, SIGMA) para obtener las diferentes concentraciones finales (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentraciones del inductor L-arabinosa en soluciones stock y concentraciones finales al realizar una dilución 1:100.

Tubo	Solución stock (%)	Concentración final (%)
1	20	0.2
2	2	0.02
3	0.2	0.002
4	0.02	0.0002
5	0.002	0.00002

4. Se añadió el inductor y se comenzó con la inducción durante 4 horas a 37°C/225 rpm. Posteriormente las bacterias se centrifugaron a máxima velocidad por cinco minutos en la Sorvall Legend Micro 21R (Mod. Micro212, Thermo Scientific) y se obtuvo un botón de bacterias que se almacenó a -20°C.

Una vez obtenida la concentración de L-arabinosa que permite una mayor expresión de la proteína, se realizaron ensayos de inducción a 6 y 8 horas con esa misma concentración.

Para esta prueba se utilizó como control positivo al vector pBAD/*Myc-His/lacZ*, que genera la expresión de una proteína de 120 kDa. Como controles negativos se utilizaron la *E. coli* BL21 y la transformación de *E. coli* BL21 con el vector pBAD/*Myc-His A*.

5.6 Análisis e identificación de las proteínas

Para conocer el peso de las proteínas se realizó un ensayo *in silico* en el programa Snapgene y así poder identificarla a través de la técnica de western blot (Sambrook 2001), que detecta específicamente la proteína utilizando anticuerpos anti-His conjugados con peroxidasa del rábano (HRP) (#R931-25, Invitrogen).

Se prepararon las muestras para electroforesis en gel de acrilamida al 12%. Cada muestra diluida 1:10 con solución tamponada de fosfatos (PBS) se mezcló con amortiguador de lisis en una proporción 1:3, después se mantuvieron a 100°C por 5 minutos. Se utilizó amortiguador SDS-PAGE en la cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell, 4-Gel System (#1658004, Bio-Rad). Las condiciones de electroforesis fueron de 100V por una hora. Se utilizó el marcador PageRuler Prestained Protein Ladder (#26616, Thermo Scientific).

Se transfirió a membrana de fluoruro de polivnilideno (PVDF), que se activó durante cinco segundos en metanol. Las condiciones de transferencia fueron 60V durante una hora en el equipo Criterion Blotter (#170-4070, Bio-Rad).

Al término de la transferencia se realizó bloqueo de la membrana durante 30 minutos con 2% de albúmina bovina (BSA; #A-4503, Sigma) en PBS Tween20 (#9005-64-5, Affymetrix) al 0.05%. Posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-histidina en una dilución 1:500 en PBS Tween20 al 0.05% y 2% de BSA durante una hora.

Se lavó la membrana con PBS Tween20 al 0.05% dos veces por cinco minutos con agitación constante. Para el revelado se utilizó 3,3'-diaminobencidina (#D5637-1G, Sigma-Aldrich) con 2 µL/mL de peróxido de hidrógeno 30% en PBS Tween20 al 0.05%.

6. Resultados y discusión

6.1 Análisis de las secuencias

Los genes de los IFN α / β se encuentran localizados en el cromosoma uno del cerdo (Cheng 2006 y Sang 2010).

La secuencia de nucleótidos original del IFN α está compuesta por 570 pb y 59% de GC; en la posición 111 se encuentra el sitio de restricción para la enzima ApaI y en la 227 para la enzima NcoI. El gen de IFN β original tiene 561 pb y 46% de GC; no presenta sitios de restricción para ninguna de las enzimas utilizadas para este trabajo (Figura 3).

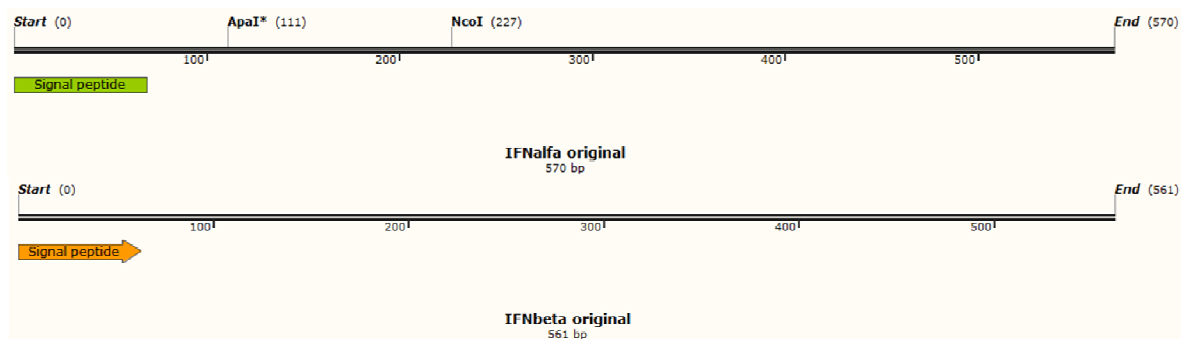


Figura 3. Secuencias originales de los genes de interferón alfa y beta porcino; tomado del NCBI con los números de acceso KF414740.1 y AY687281.1 (SnapGene).

6.2 Optimización de las secuencias y construcción de los genes de interferón alfa y beta porcino

Se realizó modificación en el 10% de los codones que componen la secuencia del gen de IFN α , y 6.9% en los del gen de IFN β . Después de la optimización se obtuvieron genes con tamaños de 586 y 591 pb y porcentajes GC de 63% y 50% respectivamente (Figura 4, Cuadro 4). En el Anexo 1 se muestran las comparaciones de las secuencias de nucleótidos nativas con las optimizadas por medio del programa BLAST del NCBI.

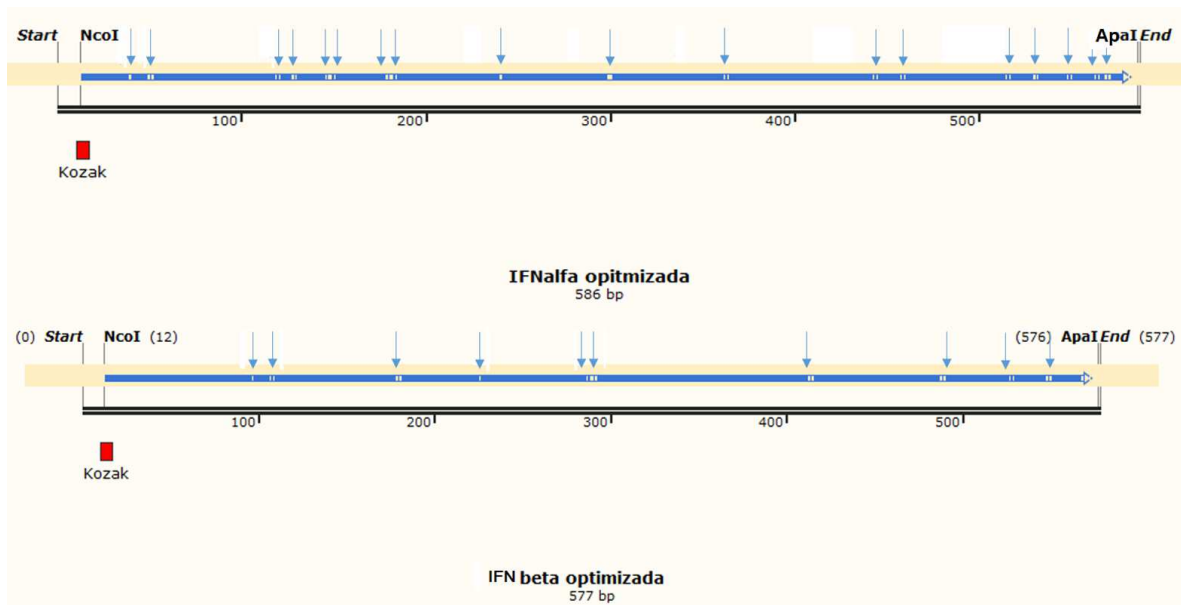


Figura 4. Alineamiento de las secuencias originales (azul) con las optimizadas (doble raya negra) de los genes de interferón alfa (superior) y beta porcino (inferior); los codones optimizados se señalan con flechas (SnapGene) .

Cuadro 4. Comparación de las secuencias genéticas originales con las optimizadas de los interferones alfa y beta porcino.

Secuencia	Interferón alfa				Interferón beta			
	Original	Optim.	Final*	Myc-His**	Original	Optim.	Final*	Myc-His**
Pares de bases (pb)	570	570	586	636	561	561	591	627
Amino-ácidos (aa)	189	189	189	212	186	186	186	209
%GC	59	63	63	63	46	50	50	50
% Codones modificados	10	-	-	-	6.9	-	-	-

* Después de agregar las secuencias Kozak y los sitios de restricción de las enzimas ApaI y NcoI.

**Cuando los genes son clonados en el vector de expresión pBAD, éste añade las secuencias que codifican para Myc y His.

Se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos originales con las optimizadas usando el programa BLAST del NCBI, en donde se observó 100% de identidad de las secuencias originales con las optimizadas en el caso de ambas proteínas (Zhang 2000; Figura 5 y 6).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
390 bits(1001)	9e-146	Compositional matrix adjust.	189/189(100%)	189/189(100%)	0/189(0%)
Query	1	MAPTSAFALTALVLLSNCNAICSLGCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRI SPFSCLDHRDFG	60		
Sbjct	1	MAPTSAFALTALVLLSNCNAICSLGCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRI SPFSCLDHRDFG	60		
Query	61	SPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQT FQLFSTEGSAAAWNESLLHQFCTGLDQQLRDLE	120		
Sbjct	61	SPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQT FQLFSTEGSAAAWNESLLHQFCTGLDQQLRDLE	120		
Query	121	ACVMQEAGLEGTPLLEEDSILAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRN	180		
Sbjct	121	ACVMQEAGLEGTPLLEEDSILAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRN	180		
Query	181	LQDRLRKKE	189		
Sbjct	181	LQDRLRKKE	189		

Figura 5. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos original y optimizada del interferón alfa porcino. Query: secuencia original; Sbjct: secuencia optimizada (BLAST).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
385 bits(988)	6e-144	Compositional matrix adjust.	186/186(100%)	186/186(100%)	0/186(0%)
Query	1	MANKCILQIALLMCFSTTALSMSYDVLRYQQRSSNLACQKLEQLPGTFQYCLEDRMNFE	60		
Sbjct	1	MANKCILQIALLMCFSTTALSMSYDVLRYQQRSSNLACQKLEQLPGTFQYCLEDRMNFE	60		
Query	61	VPEEIMQPPQFQKEDAVLI IHEMLQQIFGILRRNFSSTGWNETVIKTILVELDGQMDDE	120		
Sbjct	61	VPEEIMQPPQFQKEDAVLI IHEMLQQIFGILRRNFSSTGWNETVIKTILVELDGQMDDE	120		
Query	121	TILEEIMEEENFPRGDMTILHLKYYLSILQYLKSKEYRSCAWTVVQVEILRNFSFLNRL	180		
Sbjct	121	TILEEIMEEENFPRGDMTILHLKYYLSILQYLKSKEYRSCAWTVVQVEILRNFSFLNRL	180		
Query	181	TDYLRN	186		
Sbjct	181	TDYLRN	186		

Figura 6. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos original y optimizada del interferón beta porcino. Query: secuencia original; Sbjct: secuencia optimizada (BLAST).

Utilizando el programa DNAbuilder, se diseñaron 20 oligonucleótidos para el gen de IFN α y 16 para el de IFN β (Anexo 2). Los oligonucleótidos se alinean entre sí con 26 pares de bases (Figura 7).

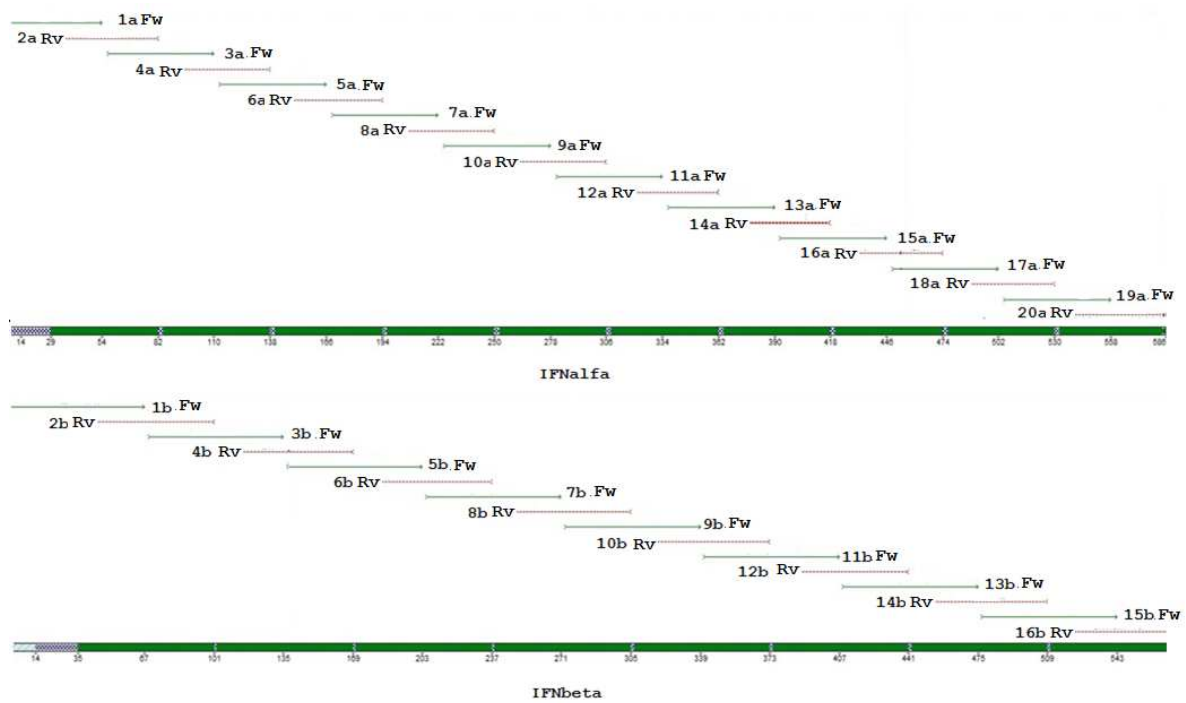


Figura 7. Alineamiento de los oligonucleótidos diseñados para la construcción de los genes de los interferones alfa y beta porcino (Bioedit).

El ensamblaje y amplificación de los genes se realizó en tres reacciones de PCR. La figura 8 corresponde a la foto de una electroforesis en gel de agarosa al 1% de estas reacciones; en los carriles 2 (IFN α) y 5 (IFN β) se encuentran las primeras reacciones de ensamblaje de cada uno de los genes; en los carriles 3 (IFN α) y 6 (IFN β) se encuentran las segundas reacciones de ensamblaje en donde se comienzan a observar bandas aún no definidas; y por último, en los carriles 4 (IFN α) y 7 (INF β) se encuentran las reacciones de amplificación de ambos genes, en donde se observan bandas definidas que, comparadas con el marcador de peso molecular

(carril 1), corresponden a los pesos esperados para cada uno de los genes (581 y 591 pb). Las bandas correspondientes a los genes de IFN α / β se cortaron del gel de agarosa y se purificaron.

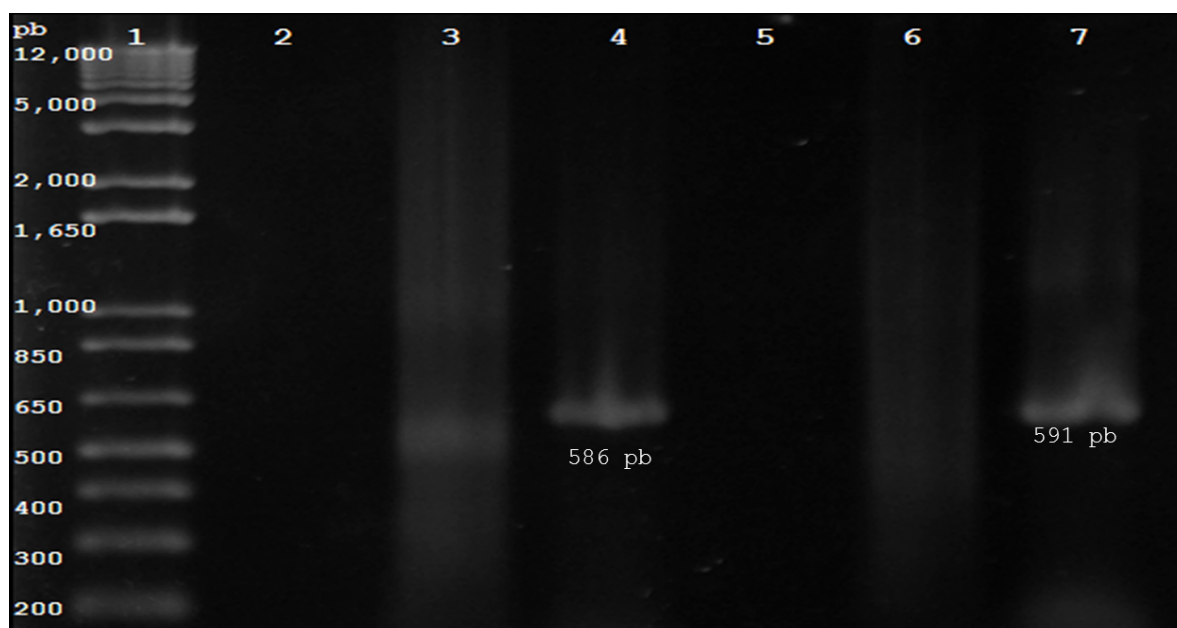


Figura 8. Ensamblaje y amplificación de los genes de interferón alfa y beta porcino en gel de agarosa al 1%. 1. Peso molecular (1 kb Plus); 2. Primer reacción de ensamblaje de los oligonucleótidos del gen de IFN α ; 3. Segunda reacción de ensamblaje; 4. Amplificación del gen del IFN α . 5. Primer reacción de ensamblaje de los oligonucleótidos del gen de IFN β ; 6. Segunda reacción de ensamblaje; 7. Amplificación del gen del IFN β .

6.3 Clonación en el vector cloneJET

Dichas purificaciones se utilizaron para la clonación en el vector CloneJET siguiendo las instrucciones del fabricante y se obtuvieron construcciones de 3547 y 3541 pb (Figura 9).

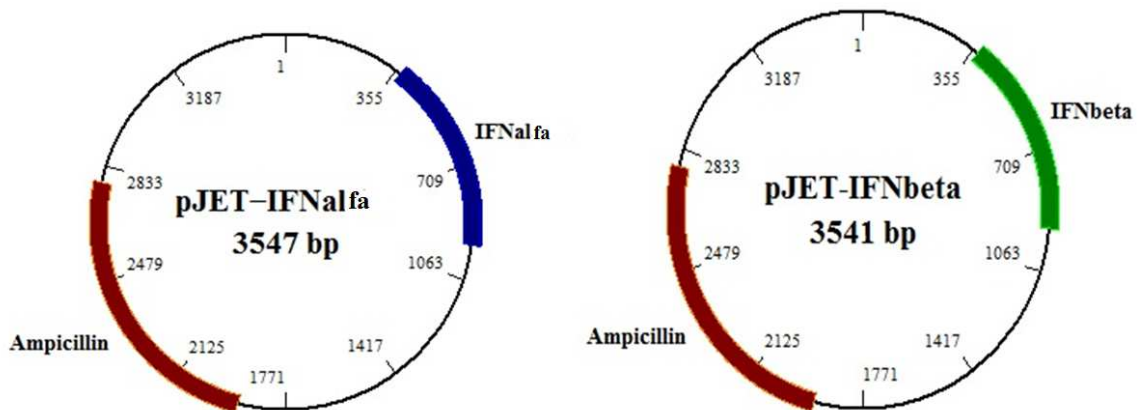


Figura 9. Mapas de clonación de los genes de interferón alfa y beta porcino en el vector cloneJET.

Las construcciones se usaron para transformar la cepa Top10 de *E. coli*, se realizó PCR de colonia y las clonas que resultaron positivas se amplificaron, y se realizó purificación del plásmido.

- **Doble digestión**

En la figura 10 se muestra la doble digestión de las construcciones purificadas con las enzimas ApaI y NcoI; en los carriles 2, 3 y 6, 7 se encuentran los controles de digestión de las enzimas NcoI y ApaI respectivamente; y en los carriles 4 y 8 se encuentran las dobles digestiones de ambas construcciones, en donde se observan bandas que coinciden con el tamaño de los genes de IFN α / β respectivamente.

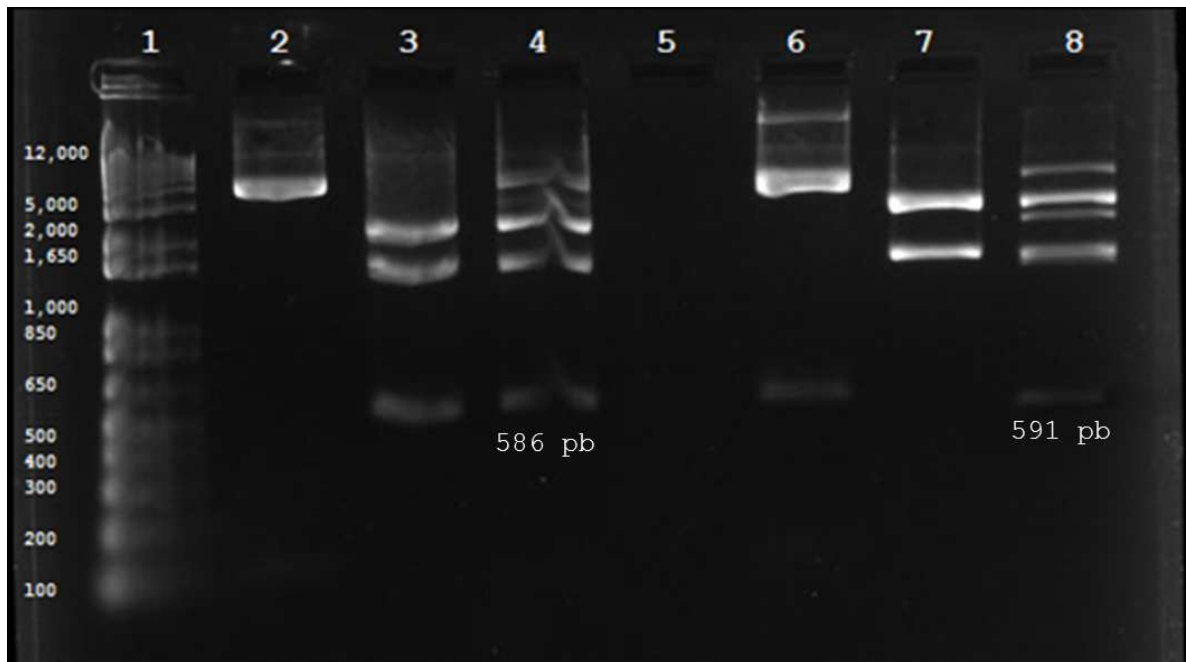


Figura 10. Doble digestión de las construcciones en el vector cloneJET en gel de agarosa al 1%. 1. Peso molecular (1 kb Plus); 2. pJET+IFN α digerido con ApaI; 3. pJET+IFN α digerido con NcoI; 4. pJET+IFN α digerido con ApaI y NcoI; 5. Vacío. 6. pJET+IFN β digerido con ApaI; 7. pJET+IFN β digerido con NcoI; 8. pJET+IFN β digerido con ApaI y NcoI.

6.4 Digestión y subclonación en el vector de expresión pBAD Myc/His A

El vector pBAD Myc-His A se digirió con las mismas enzimas (NcoI y ApaI). Al realizar la electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 11).

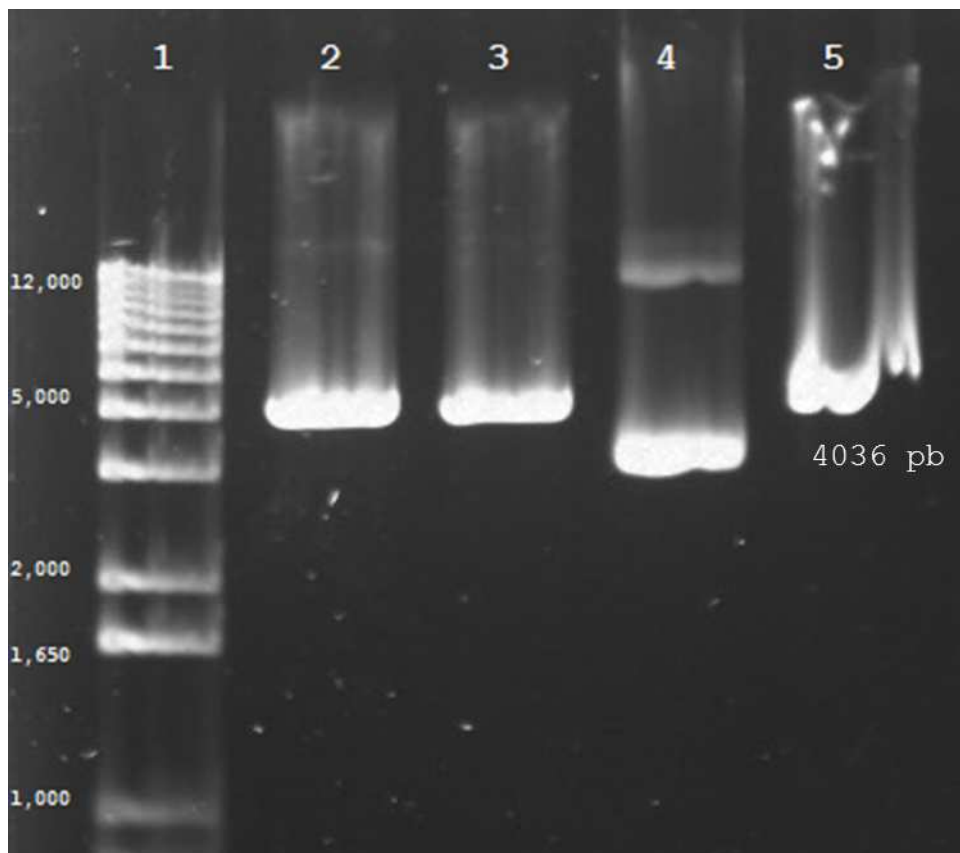


Figura 11. Doble digestión del vector pBAD Myc-His A (500 ng) en gel de agarosa al 1%. 1. Peso molecular (1 kb Plus); 2. pBAD digerido con *ApaI*; 3. pBAD digerido con *NcoI*; 4. pBAD sin digerir; 5. pBAD digerido con *NcoI* y *ApaI*.

Las bandas de los genes de IFN α/β y del vector pBAD doblemente digeridos se purificaron del gel. Las purificaciones se utilizaron para la reacción de ligación. A las construcciones obtenidas se les nombró PIFN α y PIFN β respectivamente (Figuras 12 y 13).

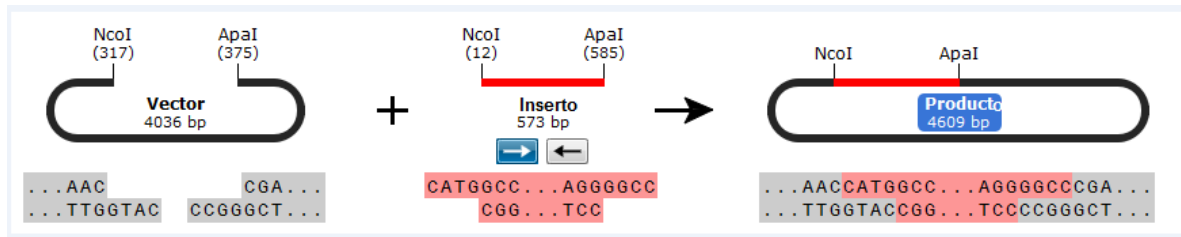


Figura 12. Esquema de digestión del vector e insertos, y reacción de ligación (representación de ambas ligaciones; SnapGene).

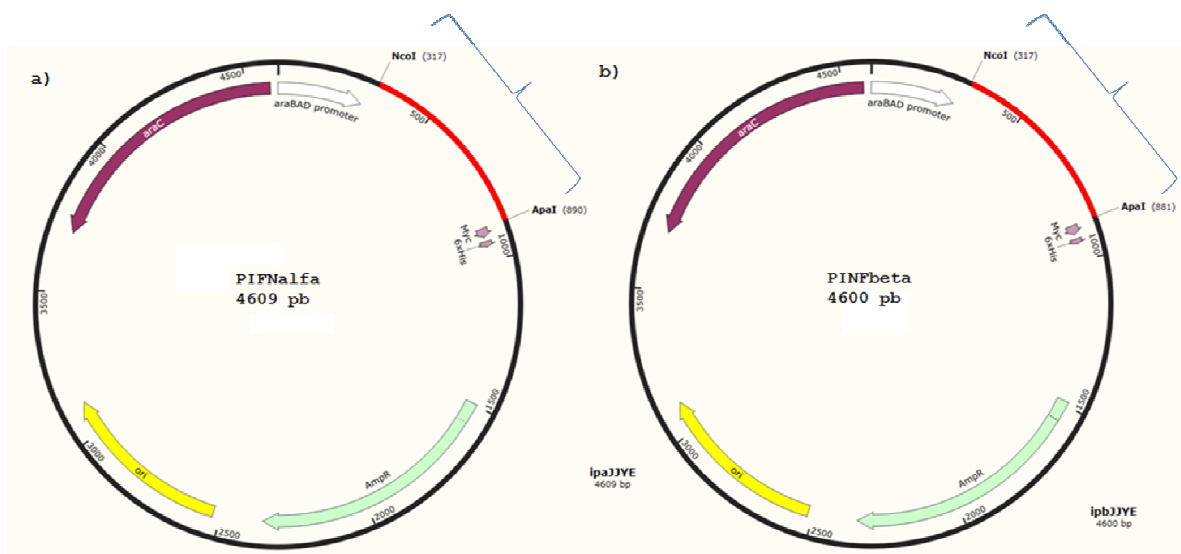


Figura 13. Mapas de construcciones en el vector de expresión pBAD. a) PIFN α ; b) PIFN β . Las llaves en azul señalan los genes (SnapGene).

Se realizó transformación en *E. coli* Top10 con las construcciones obtenidas, que crecieron en agar LB con 150 μ g/mL de ampicilina para seleccionar las colonias transformadas como se describió en el apartado 5.3 (Figura 14).

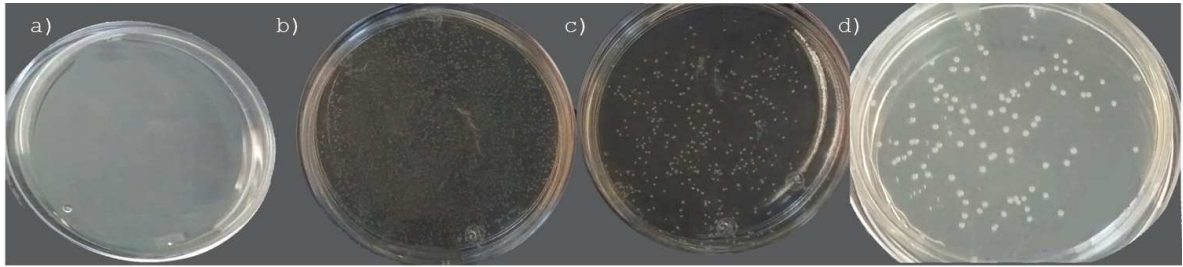


Figura 14. Transformación en *E. coli* Top10 en agar LB con 150 µg/mL de ampicilina. a) Control de células: sin transformación; b) Control positivo: vector pBAD sin digerir; c) construcción PIFN α ; d) construcción PIFN β .

Se seleccionaron colonias al azar para realizar la técnica de PCR de colonia e identificar la presencia de los genes usando los iniciadores específicos de cada una de las secuencias. Se obtuvieron dos colonias positivas a la presencia del gen de IFN α que se nombraron IFN α 4 e IFN α 5, y una colonia positiva a la presencia del gen de IFN β nombrada IFN β 1 (Figura 15).

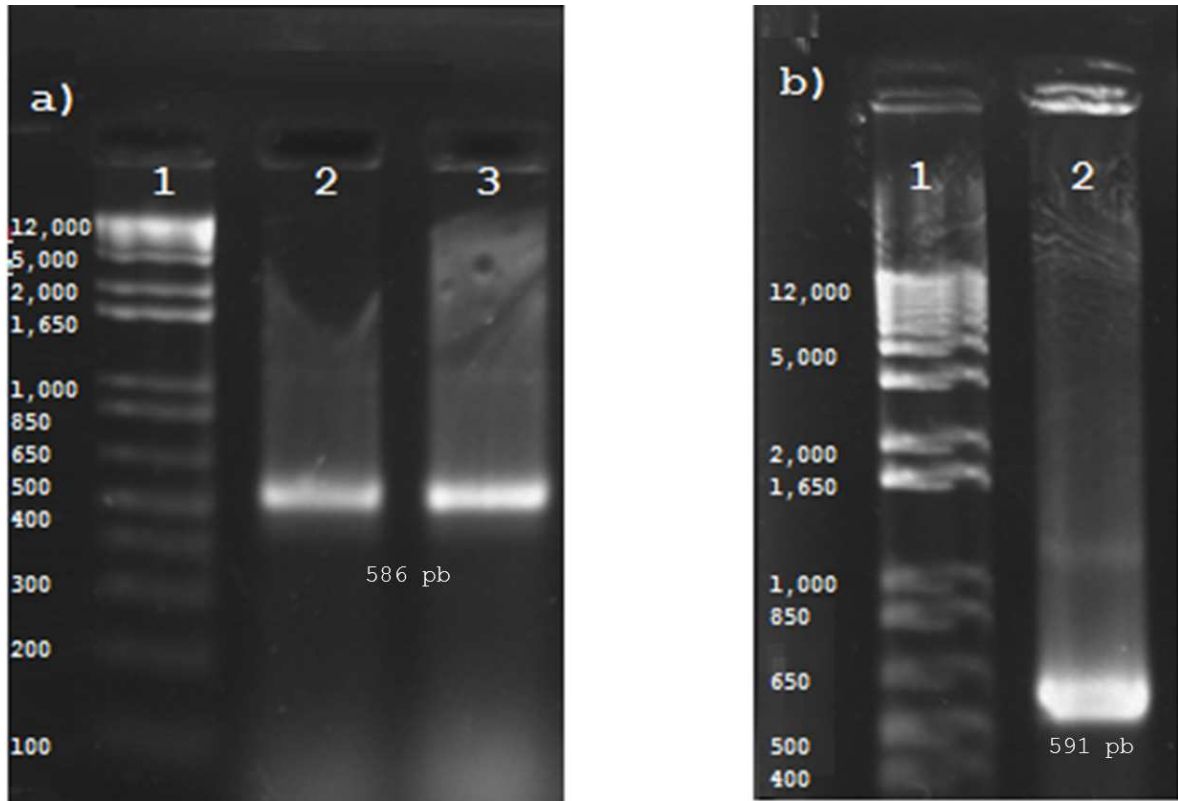


Figura 15. PCR de colonia de las transformaciones en *E. coli* Top10 en gel de agarosa al 1%. a) Colonias con la construcción PIFN α : 1. Peso molecular (1 kb Plus); 2. Clona PIFN α 4; 3. Clona PIFN α 5. b) Colonia con la construcción PIFN β : 1. Peso molecular (kb); 2. Clona PIFN β 1.

6.5 Secuenciación de las construcciones y expresión de las proteínas

Se realizó extracción de ADN plasmídico de las colonias positivas a la presencia de los genes. Dicha extracción se utilizó para realizar transformación de *E. coli* BL21 electrocompetente (Figura 16).

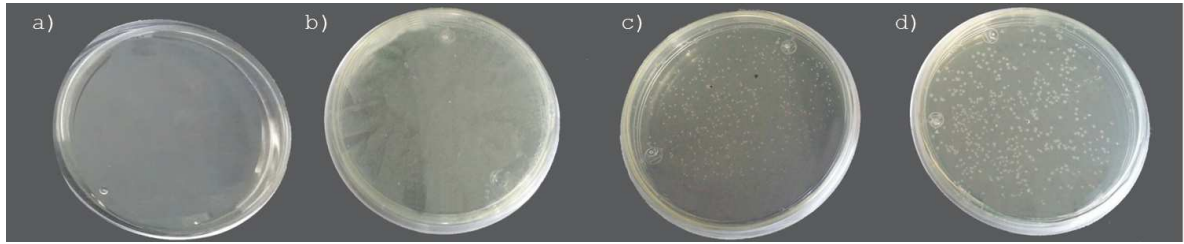


Figura 16. Transformación en *E. coli* BL21 en agar LB con 150 µg/mL de ampicilina. a) Control de células: sin transformación; b) control positivo: vector pBAD sin digerir; c) construcción PIFN α ; d) construcción PIFN β .

Para verificar la presencia de los genes en estas transformaciones se realizó PCR de colonia, y se hizo una electroforesis en donde se observaron los fragmentos de 586 y 591 correspondientes a los genes de IFN α y β (Figura 17).

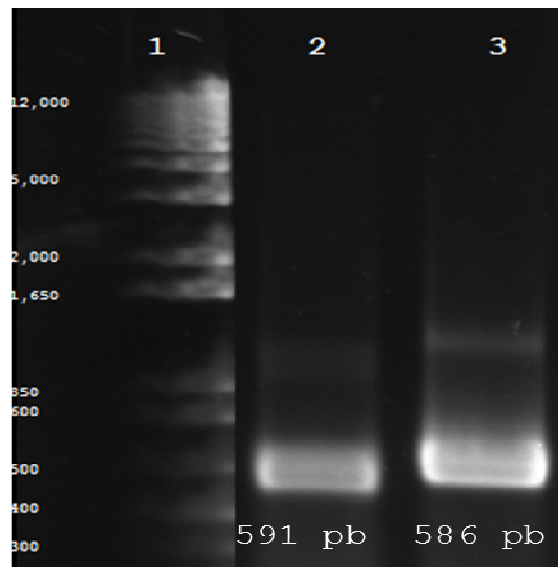


Figura 17. PCR de colonia de las transformaciones en *E. coli* BL21 en gel de agarosa al 1%. 1. Peso molecular (1 kb Plus); 2. Colonia con el gen de IFN α ; 3. Colonia con el gen de IFN β .

Las colonias de la cepa BL21 que resultaron positivas a la presencia del gen se amplificaron para realizar extracción de DNA. Se realizó secuenciación a partir de este purificado ya que se obtuvo directamente de la cepa en la que se realizó la expresión, asegurando el conocimiento de la secuencia expresada.

Se realizó comparación de la secuenciación y se obtuvo 100% de similitud de IFN α 4 e IFN β 1 con sus respectivas secuencias optimizadas. En el análisis no se encontraron codones de paro ni cambios que alteraran la secuencia o su marco de lectura, haciendo dichas secuencias óptimas para la expresión de las proteínas (Figura 18).

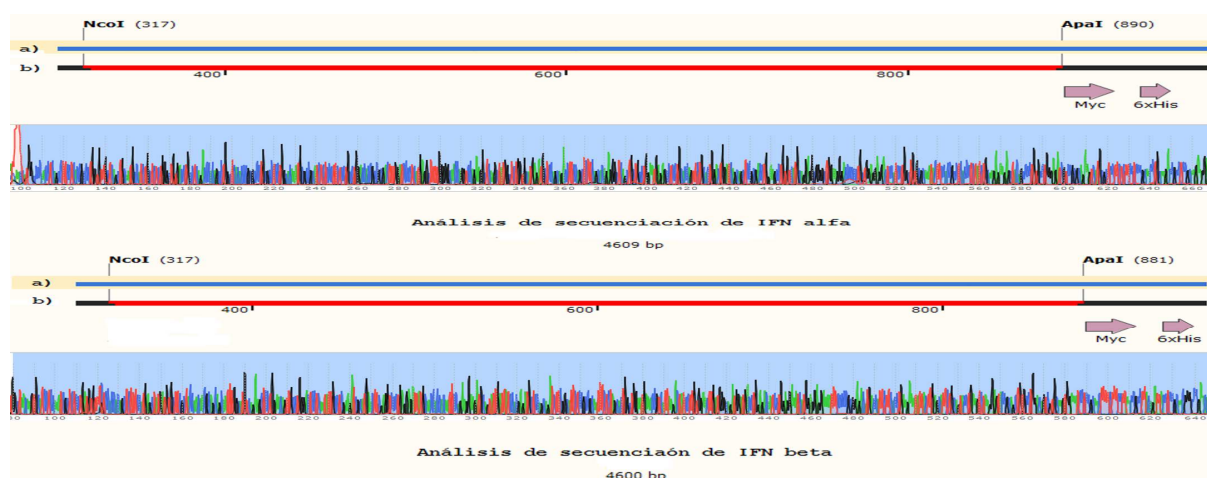


Figura 18. Comparación de la secuenciación (a) con la secuencia optimizada (b) de los genes de interferón alfa y beta porcino y sus cromatogramas (SnapGene).

- **Expresión de las proteínas**

Se realizó la inducción con las diferentes concentraciones de L-arabinosa (0.2, 0.02, 0.002 y 0.0002%) durante cuatro, seis y ocho horas a 37°C/225 rpm. Se obtuvieron las muestras de cada una de las inducciones correspondientes a los botones de las bacterias.

6.6 Análisis e identificación de las proteínas

Se realizó análisis *in silico* para determinar los pesos de las proteínas recombinantes. El IFN α tiene un total de 212 aminoácidos y un peso de 23.4kDa y el IFN β tiene 209 aminoácidos y un peso de 24.6kDa. El porcentaje de aminoácidos que las componen se encuentran descritos en la figura 19.

a)		Whole Protein		
Length		212 aa		
Molecular Weight		23,979.99 Da		
Amino Acid		Number	Percent	
A	Ala Alanine	20	9.43	
C	Cys Cysteine	7	3.30	
D	Asp Aspartic Acid	9	4.25	
E	Glu Glutamic Acid	16	7.55	
F	Phe Phenylalanine	9	4.25	
G	Gly Glycine	9	4.25	
H	His Histidine	13	6.13	
I	Ile Isoleucine	5	2.36	
K	Lys Lysine	6	2.83	
L	Leu Leucine	30	14.15	
M	Met Methionine	6	2.83	
N	Asn Asparagine	5	2.36	
P	Pro Proline	7	3.30	
Q	Gln Glutamine	15	7.08	
R	Arg Arginine	14	6.60	
S	Ser Serine	19	8.96	
T	Thr Threonine	9	4.25	
V	Val Valine	8	3.77	
W	Trp Tryptophan	2	0.94	
Y	Tyr Tyrosine	3	1.42	

b)		Whole Protein		
Length		209 aa		
Molecular Weight		24,630.90 Da		
Amino Acid		Number	Percent	
A	Ala Alanine	7	3.35	
C	Cys Cysteine	5	2.39	
D	Asp Aspartic Acid	10	4.78	
E	Glu Glutamic Acid	20	9.57	
F	Phe Phenylalanine	8	3.83	
G	Gly Glycine	6	2.87	
H	His Histidine	8	3.83	
I	Ile Isoleucine	15	7.18	
K	Lys Lysine	9	4.31	
L	Leu Leucine	28	13.40	
M	Met Methionine	9	4.31	
N	Asn Asparagine	10	4.78	
P	Pro Proline	6	2.87	
Q	Gln Glutamine	16	7.66	
R	Arg Arginine	10	4.78	
S	Ser Serine	13	6.22	
T	Thr Threonine	10	4.78	
V	Val Valine	9	4.31	
W	Trp Tryptophan	2	0.96	
Y	Tyr Tyrosine	8	3.83	

Figura 19. Análisis de las proteínas de interferón alfa (a) beta (b) porcino recombinantes (SnapGene).

- **Western blot**

Para la identificación de la proteína se desnaturalizaron los botones de bacterias para realizar la técnica de western blot, que consiste en la separación de las proteínas por medio de electroforesis en gel de acrilamida y la posterior transferencia a membrana de PVDF en donde se incubó con anticuerpos anti-His marcados con HRP y se reveló la presencia de las proteínas con DAB.

La figura 20 corresponde a la membrana de PVDF en donde se observa la expresión del IFN α en las bacterias inducidas durante cuatro horas con las concentraciones de L-arabinosa de 0.2% (carril 5) y 0.02% (carril 6), siendo la concentración de 0.2% en donde se observa una banda más gruesa y definida en el peso de 23.9 kDa esperado.

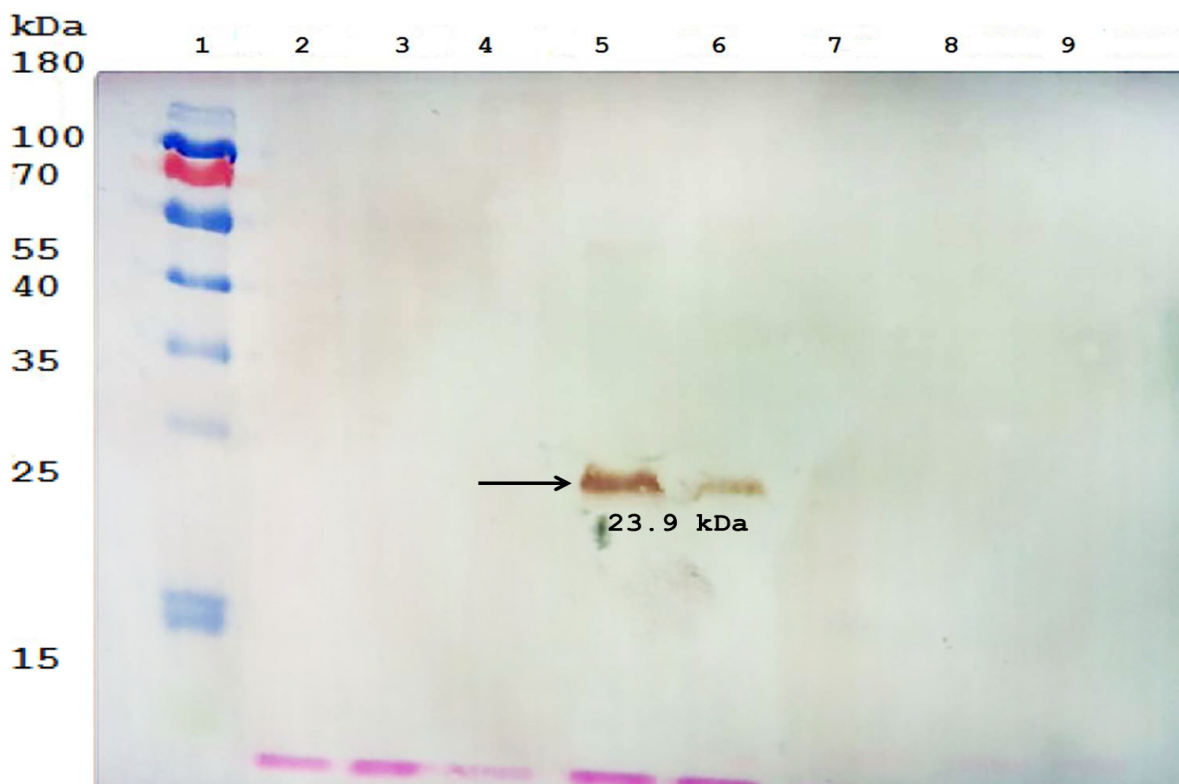


Figura 20. Identificación del interferón alfa porcino recombinante en membrana de PVDF con anticuerpos anti-His; inducciones de *E. coli* BL21 con diferentes concentraciones de L-arabinosa por 4 horas. 1. Peso molecular (kDa); 2. Control de células: sin transformación; 3. pBAD Myc-His A; 4. PIFN α sin inducción; 5. PIFN α 0.2% L-arabinosa; 6. PIFN α 0.02% L-arabinosa; 7. PIFN α 0.002% L-arabinosa; 8. PIFN α 0.0002% L-arabinosa; 9. PIFN α 0.00002% L-arabinosa.

Una vez encontrada la concentración de L-arabinosa a la que se indujo una mejor expresión de la proteína, se realizaron inducciones a cuatro, seis y ocho horas (Figura 21), en donde se observó una banda más gruesa en la inducción de 8 horas (carril 8).

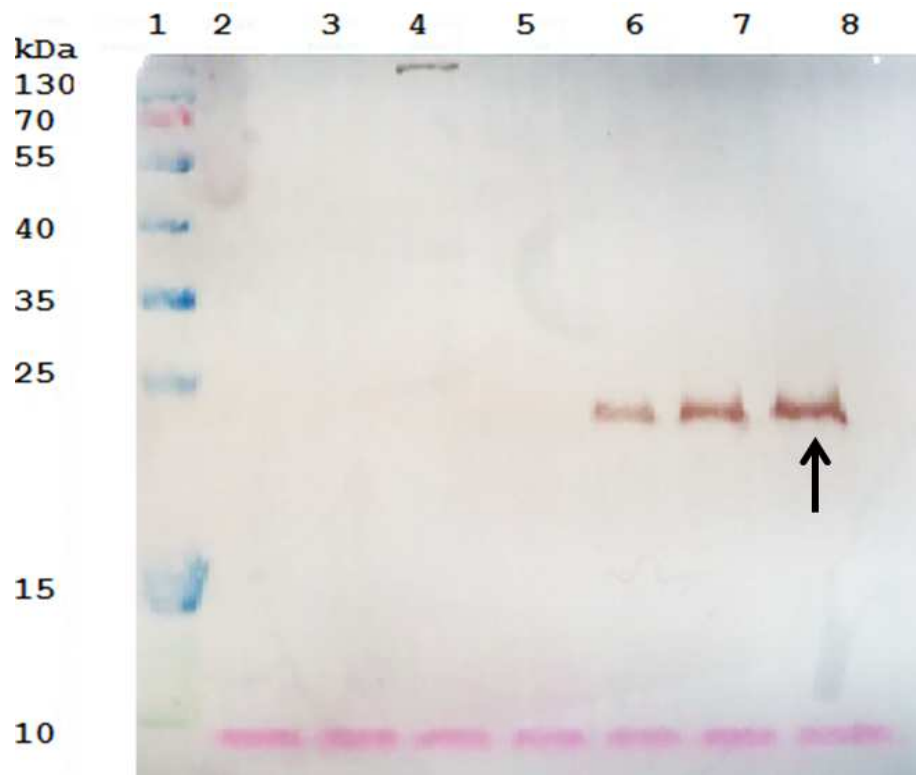


Figura 21. Identificación del interferón alfa porcino en membrana de PVDF con anticuerpos anti-His; inducciones de *E. coli* BL21 con 0.2% de L-arabinosa a diferentes tiempos. 1. Peso molecular (kDa); 2. Sin transformación; 3. pBAD Myc-His A; 4. pBAD/Myc-His/LacZ; 5. PIFN α sin inducción; 6. PIFN α inducido 4 horas; 7. PIFN α inducido 6 horas; 8. PIFN α inducido 8 horas.

La expresión del IFN β no se detectó usando diferentes concentraciones de L-arabinosa, sin embargo se decidió

utilizar la misma concentración en que se encontró la mayor expresión de PIFN α a diferentes tiempos (Figura 22), y la expresión se encontró en la incubación de seis y ocho horas (carriles 7 y 8) a concentración de 0.2% de L-arabinosa. Sin embargo, se observa la presencia de dos bandas cercanas al peso de 24.6 kDa esperado, que se atribuye a un problema en el corrimiento de la electroforesis en el gel de acrilamida, ya que el control se observa igualmente con el doble bandeo.

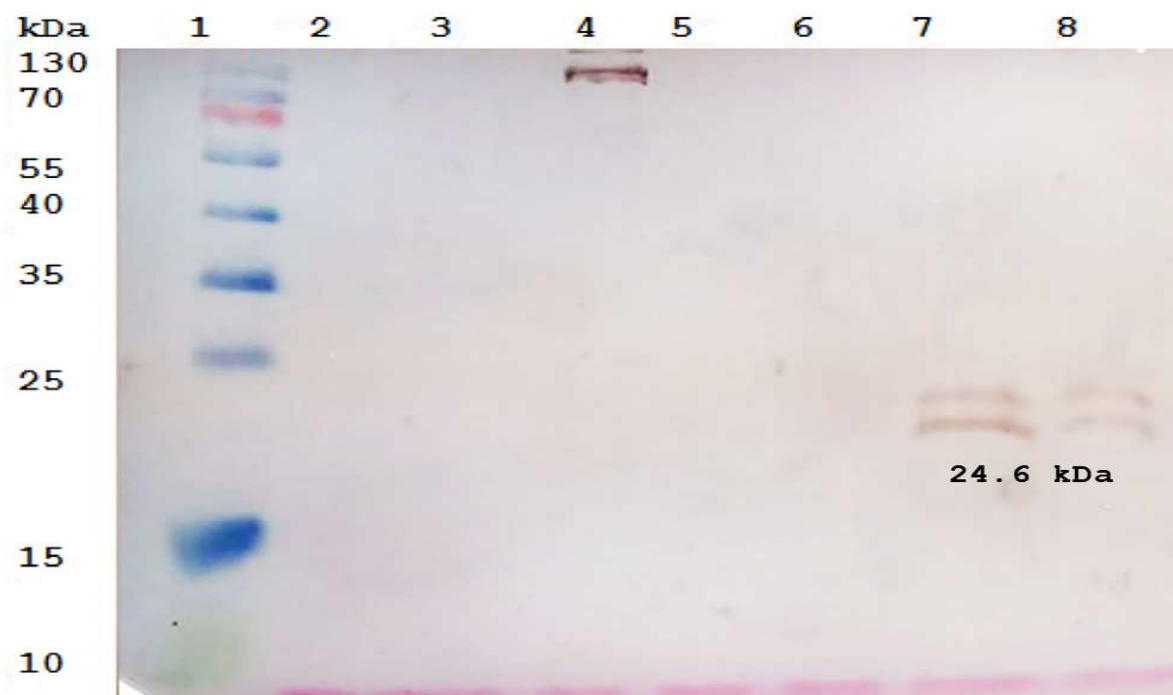


Figura 22. Identificación del interferón beta porcino recombinante en membrana de PVDF con anticuerpos anti-His; inducciones de *E. coli* BL21 con 0.2% de L-arabinosa a diferentes tiempos. 1. Peso molecular (kDa); 2. Sin transformación; 3. pBAD Myc-His A; 4. pBAD/Myc-His/LacZ; 5. PIFN β sin inducción; 6. PIFN β inducida durante 4 horas; 7. PIFN β inducida durante 6 horas; 8. PIFN β inducida durante 8 horas.

Estos resultados muestran evidencia de la expresión de los interferones alfa y beta porcinos como proteínas recombinantes en *Escherichia coli* BL21, utilizando secuencias optimizadas. Lo que permite el desarrollo de estudios subsecuentes para la evaluación de su actividad biológica.

7 . Conclusiones

- La optimización de las secuencias de nucleótidos no modifica la secuencia de aminoácidos de los interferones alfa y beta porcinos.
- Se obtuvo la clonación en el vector de expresión pBAD Myc-His A mediante el uso de las enzimas de restricción NcoI y ApaI.
- La expresión de los interferones alfa y beta porcinos recombinantes en *Escherichia coli* BL21, se ve favorecida con el uso de L-arabinosa al 0.2% durante 8 horas a 37°C a 225 rpm.
- Se detectó la presencia de dos proteínas de aproximadamente 23.9 y 24.6 kDa, por medio de anticuerpos anti-His marcados con HRP, correspondientes a los interferones alfa y beta recombinantes.
- La optimización de secuencias no interfiere con la expresión de los interferones alfa y beta porcinos recombinantes en *Escherichia coli* BL21.

8 . Prospectiva

- Purificar los interferones porcinos recombinantes alfa y beta.
- Evaluar su actividad biológica *in vitro* e *in vivo*.
- Evaluar la posibilidad de encapsularlos con quitosano.

Anexo 1. Alineamiento de las secuencias originales de los genes con las secuencias optimizadas (BLAST)

Gen de interferón alfa

Range 1: 14 to 580 Graphics		▼ Next Match ▲ Previous Match		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
854 bits(462)	0.0	532/567(94%)	0/567(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGCCCCAACCTCAGCCTTCCTCACGGCCCTGGTGCTACTCAGCTGCAATGCCATCTGC	60		
Sbjct 14	ATGGCCCCAACCTCAGCCTTCCTCACAGCCCTGGTGTGCTCAGCTGCAATGCCATCTGC	73		
Query 61	TCTCTGGGCTGTGACCTGCCTCAGACCCACAGCCTGGCTCACACCCAGGGCCCTGAGGCTC	120		
Sbjct 74	TCTCTGGGCTGTGACCTGCCTCAGACCCACAGCCTGGCTCACACCCGCGCCCTGCGCTC	133		
Query 121	CTGGCACAAATGAGGAGAATCTCTCCCTTCTCCTGCCTGGACCACAGAAGGGACTTTGGA	180		
Sbjct 134	CTGGCACAAATGCGCCGCATCTCTCCCTTCTCCTGCCTGGACCACCGCCGCGACTTTGGA	193		
Query 181	TCCCCTCATGAGGCTTTTGGGGCAACCAAGGTCCAGAAGGCTCAAGCCATGGCTCTGGTG	240		
Sbjct 194	TCCCCTCATGAGGCTTTTGGGGCAACCAAGGTCCAGAAGGCTCAAGCAATGGCTCTGGTG	253		
Query 241	CATGAGATGCTCCAGCAGACCTTCCAGCTTTTCCAGCAGAGGGCTCGGCTGCTGCCTGG	300		
Sbjct 254	CATGAGATGCTCCAGCAGACCTTCCAGCTTTTCCAGCAGAGGGCAGTGCTGCTGCCTGG	313		
Query 301	AATGAGAGCCTCCTGCACCAGTTCTGCACTGGACTGGATCAGCAGCTCAGGGACCTGGAA	360		
Sbjct 314	AATGAGAGCCTCCTGCACCAGTTCTGCACTGGACTGGATCAGCAGCTCCGCGACCTGGAA	373		
Query 361	GCCTGTGTATGCAGGAGGGGGGGCTGGAAGGGACCCCTGCTGGAGGAGGACTCCATC	420		
Sbjct 374	GCCTGTGTATGCAGGAGGGGGGGCTGGAAGGGACCCCTGCTGGAGGAGGACTCCATC	433		
Query 421	CTGGCTGTGAGGAAATACTTCCACAGACTCACCTCTATCTGCAAGAGAAGAGCTACAGC	480		
Sbjct 434	CTGGCTGTGCGCAAATACTTCCACCGCCTCACCTCTATCTGCAAGAGAAGAGCTACAGC	493		
Query 481	CCCTGTGCCTGGGAGATCGTCAGGGCAGAAGTCATGAGATCCTTCTCTCCTCCAGAAAC	540		
Sbjct 494	CCCTGTGCCTGGGAGATCGTCCGCGCAGAAGTCATGCGCTCCTTCTCTCCTCCCGCAAC	553		
Query 541	CTGCAAGACAGACTCAGGAAGAAGGAG	567		
Sbjct 554	CTGCAAGACCGCTCCGCAAGAAGGAG	580		

Gen de interferón beta

Range 1: 14 to 571 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
931 bits(504)	0.0	540/558(97%)	0/558(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGCTAAC AAGTGCATCCTCCAAATCGCTCCTGATGTGTTTCTCCACCACAGCTCTT			60
Sbjct 14	ATGGCTAAC AAGTGCATCCTCCAAATCGCTCCTGATGTGTTTCTCCACCACAGCTCTT			73
Query 61	TCCATGAGCTATGATGTGCTTCGATACCAACAAAGGAGCAGCAATTTGGCATGTCAGAAAG			120
Sbjct 74	TCCATGAGCTATGATGTGCTTCGCTACCAACAACGCAGCAGCAATTTGGCATGTCAGAAAG			133
Query 121	CTCCTGGAACAGTTGCCTGGGACTCCTCAATATTGCCTCGAAGATAGGATGAACTTCGAG			180
Sbjct 134	CTCCTGGAACAGTTGCCTGGGACTCCTCAATATTGCCTCGAAGATCGCATGAACTTCGAG			193
Query 181	GTCCCTGAGGAGATTATGCAACCACCACAATTCAGAAAGGAAGATGCAGTATTGATTATC			240
Sbjct 194	GTCCCTGAGGAGATTATGCAACCACCACAATTCAGAAAGGAAGATGCAGTATTGATTATC			253
Query 241	CACGAGATGCTCCAGCAGATCTTCGGCATTCTCAGAAAGAAATTTCTCTAGCACTGGCTGG			300
Sbjct 254	CACGAGATGCTCCAGCAGATCTTCGGCATTCTCCGCCGCAATTTCTCTAGCACTGGCTGG			313
Query 301	AATGAAACCGTCATTAAGACTATCCTTGTGGAACCTTGATGGGCAGATGGATGACCTGGAG			360
Sbjct 314	AATGAAACCGTCATTAAGACTATCCTTGTGGAACCTTGATGGGCAGATGGATGACCTGGAG			373
Query 361	ACAATCCTGGAGGAAATCATGGAGGAGGAAAATTTCCCCAGGGGAGACATGACCATTCTT			420
Sbjct 374	ACAATCCTGGAGGAAATCATGGAGGAGGAAAATTTCCCCCGGGAGACATGACCATTCTT			433
Query 421	CACCTGAAGAAATATTACTTGAGCATTCTGCAGTACCTGAAGTCCAAGGAGTACAGAAGC			480
Sbjct 434	CACCTGAAGAAATATTACTTGAGCATTCTGCAGTACCTGAAGTCCAAGGAGTACCGCAGC			493
Query 481	TGTGCCTGGACAGTCGTCCAAGTGGAAATCCTCAGGAACCTTTCTTTCTTAAACAGACTT			540
Sbjct 494	TGTGCCTGGACAGTCGTCCAAGTGGAAATCCTCCGCAACTTTCTTTCTTAAACCGCCTT			553
Query 541	ACAGATTACCTCCGGAAC	558		
Sbjct 554	ACAGATTACCTCCGCAAC	571		

Anexo 2. Diseño de los oligonucleótidos

Gen de interferón alfa

Nombre Secuencia 5'-3'

1aFw	GCGGCCGCTC ACCATGG CCCCAACCTCAGCCTTCCTCACAGCCCTGGTGTGCT
2aRv	GCCCAGAGAGCAGATGGCATTGCAGCTGAGCAACACCAGGGCTGTGAGGAAGGC
3aFw	GCTGCAATGCCATCTGCTCTCTGGGCTGTGACCTGCCTCAGACCCACAGCCTGG
4aRv	GCCAGGAGGCGCAGGGCGCGGGTGTGAGCCAGGCTGTGGGTCTGAGGCAGGTCA
5aFw	CACACCCGCGCCCTGCGCCTCCTGGCACAAATGCGCCGCATCTCTCCCTTCTCC
6aRv	ATCCAAAGTCGCGGCGGTGGTCCAGGCAGGAGAAGGGAGAGATGCGGCGCATTT
7aFw	CCTGGACCACCGCCGCGACTTTGGATCCCCTCATGAGGCTTTTGGGGGCAACCA
8aRv	CAGAGCCATTGCTTGAGCCTTCTGGACCTGGTTGCCCCAAAAGCCTCATGAGG
9aFw	TCCAGAAGGCTCAAGCAATGGCTCTGGTGCATGAGATGCTCCAGCAGACCTTCC
10aRv	GCAGCACTGCCCTCTGTGCTGAAGAGCTGGAAGGTCTGCTGGAGCATCTCATGC
11aFw	CTCTTCAGCACAGAGGGCAGTGCTGCTGCCTGGAATGAGAGCCTCCTGCACCAG
12aRv	GGAGCTGCTGATCCAGTCCAGTGCAGAACTGGTGCAGGAGGCTCTCATTCCAGG
13aFw	CTGCACTGGACTGGATCAGCAGCTCCGCGACCTGGAAGCCTGTGTCATGCAGGA
14aRv	CAGCAGGGGGTCCCTTCCAGCCCCGCTCCTGCATGACACAGGCTTCCAGGTC
15aFw	CGGGGCTGGAAGGGACCCCCCTGCTGGAGGAGGACTCCATCCTGGCTGTGCGCA
16aRv	AGATAGAGGGTGAGGCGGTGGAAGTATTTGCGCACAGCCAGGATGGAGTCCTCC
17aFw	TACTTCCACCGCCTCACCTCTATCTGCAAGAGAAGAGCTACAGCCCCTGTGCC
18aRv	GCATGACTTCTGCGGGACGATCTCCAGGCACAGGGGCTGTAGCTCTTCTCTT
19aFw	GGAGATCGTCCGCGCAGAAGTCATGCGCTCCTTCTTCTCCTCCCGCAACCTGCA
20aRv	GGGCCCCCTCCTTCTTGCGGAGGCGGTCTTGCAGGTTGCGGGAGGAAGAGAAGGA

Gen interferón beta

Nombre Secuencia 5'-3'

1bFw GCGGCCGCTC**ACCATGG**CTAACAAAGTGCATCCTCCAAATCGCTCTCCTGATG
TGTTTCTCCACCACA

2bRv GGTAGCGAAGCACATCATAGCTCATGGAAAGAGCTGTGGTGGAGAAACACAT
CAGGAGAGCGATTTG

3bFw CTCTTTCCATGAGCTATGATGTGCTTCGCTACCAACAACGCAGCAGCAATTT
GGCATGTCAGAAGCT

4bRv GCAATATTGAGGAGTCCCAGGCAACTGTTCCAGGAGCTTCTGACATGCCAAA
TTGCTGCTGCGTTGT

5bFw CTGGAACAGTTGCCTGGGACTCCTCAATATTGCCTCGAAGATCGCATGAACT
TCGAGGTCCCTGAGG

6bRv TCTTCCTTCTGGAATTGTGGTGGTTGCATAATCTCCTCAGGGACCTCGAAGT
TCATGCGATCTTCGA

7bFw GATTATGCAACCACCACAATTCCAGAAGGAAGATGCAGTATTGATTATCCAC
GAGATGCTCCAGCAG

8bRv TGCTAGAGAAATTGCGGCGGAGAATGCCGAAGATCTGCTGGAGCATCTCGTG
GATAATCAATACTGC

9bFw TCTTCGGCATTCTCCGCCGCAATTTCTCTAGCACTGGCTGGAATGAAACCGT
CATTAAAGACTATCCT

10bRv CTCAGGTCATCCATCTGCCCATCAAGTTCCACAAGGATAGTCTTAATGACG
GTTTCATTCCAGCCA

11bFw GTGGAACTTGATGGGCAGATGGATGACCTGGAGACAATCCTGGAGGAAATCA
TGGAGGAGGAAAATT

12bRv TTCAGGTGAAGAATGGTCATGTCTCCGCGGGGGAAATTTTCTCCTCCATGA
TTTCTCCTCAGGATTG

13bFw CCCCCGCGGAGACATGACCATTCTTCACCTGAAGAAATATTACTTGAGCATT
CTGCAGTACCTGAAG

14bRv CGACTGTCCAGGCACAGCTGCGGTACTCCTTGGACTTCAGGTACTGCAGAAT
GCTCAAGTAATATTT

15bFw CCAAGGAGTACCGCAGCTGTGCCTGGACAGTCGTCCAAGTGGAAATCCTCCG
CAACTTTTCTTTTCT

16bRv GGGCCCGTTGCGGAGGTAATCTGTAAGGCGGTTAAGGAAAGAAAAGTTGCGG
AGGATTTCCACTTGG

Anexo 3. Medios y Reactivos

Geles de acrilamida al 12%

Para preparar los geles de acrilamida, las soluciones se deben colocar en el orden mencionado en los siguientes cuadros.

Gel separador (acrilamida 12%)

Solución	Volumen (ml)
Resolving buffer 4x (pH 8.8)	1.25
Agua	1.75
Acrilamida 30%	2
APS 10%	0.05
TEMED	0.005

Gel concentrador (acrilamida 4.5%)

Solución	Volumen (ml)
Stacking buffer 4x (pH 6.8)	0.313
Agua	0.750
Acrilamida 30%	0.188
APS 10%	0.025
TEMED	0.002

Buffer TBE 10X

108 g Base Tris

55 g Ácido bórico

9.3 g EDTA

Para un volumen de 1 L

Gel de Agarosa 1%

10 mL Buffer TBE 10X

1 g Agarosa

Para un volumen de 100 mL

Medio LB

10 g Bacto-triptona

5 g Extracto de levadura

10 g NaCl

Para un volumen de 1 L. Ajustar pH a 7.5. Esterilizar en autoclave.

Agar LB

10 g Bacto-triptona

5 g Extracto de levadura

10 g NaCl

15 g Agar bacteriológico

Para un volumen de 1 L. Esterilizar en autoclave.

Medio GYT

100 g Glicerol

1.25 g Extracto de levadura

2.5 g Triptona

Para un volumen de 1 L. Esterilizar en autoclave.

Medio SOC

20 g Bacto-triptona
5 g Extracto de levadura
2 mL NaCl 5 M
2.5 mL KCl 1M
10 mL MgCl₂ 1 M
10 mL MgSO₄ 1 M
20 mL Glucosa 1 M

Para un volumen de 1 L. Esterilizar en autoclave.

Buffer de carga SDS

4 g SDS
10 g 2-mercaptoetanol
20 mL Glicerol
0.004 g Azul de bromofenol
12.5 mL Tris-HCl 1M

Para un volumen de 10 Ml. Ajustar pH a 6.8.

Acrilamida 30%

29 g Acrilamida
1 g Bis-acrilamida
Para un volumen de 100 mL.

Buffer separador 4x

50 mL Tris 3 M pH 8.8
0.4 g SDS
Para un volumen de 100 mL.

Buffer concentrador 4x

50 mL Tris 1 M pH 6.8

4 g SDS

Para un volumen de 100 mL.

Buffer de corrida SDS

25 mL Tris 1 M

250 mL Glicina 1 M pH 8.3

1 g SDS

Para un volumen de 1 L.

Azul de Coomassie

0.2 g Azul de Coomassie

45 mL Metanol

10 mL Ácido acético glacial

Para un volumen de 100 mL.

Solución destiñidora

20 mL Metanol

15 mL Ácido acético glacial

Para un volumen de 100 mL.

Buffer de transferencia

48 mL Tris base 1 M

39 mL Glicina 1 M

20 mL Metanol

0.003 g SDS

PBS

8 g NaCl

0.2 g KCl

1.44 g Na₂HPO₄

0.24 g KH₂PO₄

Para un volumen de 1 L.

PBS Tween-20

1 g Tween-20

PBS cbp un volumen de 1 L.

Referencias

1. Arighi C (Lead Team). 2002–2006. *UniProt, Consortium* [medio electrónico]. Hinxton Cambridge, United Kingdom: European Bioinformatics Institute. <http://www.uniprot.org> [consulta: 16 sept 2016].
2. Babiuk LA, Sordillo LM, Campos M, Hughes HPA, Campos R, Harland R. 1991. Application of interferons in the Control of Infectious Diseases of Cattle. *Journal of Dairy Science*. 74:4385–4398.
3. Bai Y, Tong T, Liu G, Chen W, Zhang W, Wang Q, Yang T, Bu Z, Wu D. 2010. Expression of biologically active recombinant equine interferon- γ in *Escherichia coli*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 33:333–342. DOI: 10.1016/j.cimid.2008.12.004.
4. Banerjee S. 2016. RNase L and the NLRP3-inflammasome: An old merchant in a new trade. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 29:63–70.
5. Bao Z-J, Zhao S, Haq IUI, Zeng S-M. 2014. Recombinant bovine interferon- τ enhances in vitro development of bovine embryos by upregulating expression of connexin 43 and E-cadherin. *Journal of Dairy Science*. 97:6917–6925. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8106>.

- 6.Barber GN. 2001. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 8:113-126.
- 7.Bauer EM, Zheng H, Lotze MT, Bauer PM. 2014. Recombinant Human Interferon Alpha 2b Prevents and Reverses Experimental Pulmonary Hypertension. *PLoS ONE*. 9(5):e96720. DOI: 10.1371/journal.pone.0096720.
- 8.Bekisz J, Schmeisser H, Hernandez J, Goldman ND, Zoon KC. 2004. Human Interferons Alpha, Beta and Omega. *Growth Factors*. 22(4):243-251.
- 9.Belcha F. 1991. Cytokines: Applications in Domestic Food Animals. *Journal of Dairy Science*. 74(1):328-339.
- 10.Biron CA, Daod M, Salazar-Mather TP. 2002. Innate immunity and viral infections. En Kaufmann SHE, Sher A, Ahmed R. *Immunology of infectious diseases*. Washington, DC, USA: ASM Press.
- 11.Biron CA. 1998. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN- α/β), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Immunology*. 10:383-390.
- 12.Bodgan C. 2000. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Current Opinion in Immunology*. 12:419-424.

13. Borovkov AY, Loskutov AV, Robida MD, Day KM, Cano JA, Olson TL, Patel H, Brown K, Hunter PD and Sykes KF. 2010. High-quality assembly directly from unpurified mixtures of microarray-synthesized oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*. 38(19):e180. DOI: 10.1093/nar/gkq677.
14. Bouzidi MS, Caval V, Suspène R, Hallez C, Pineau P, Wain-Hobson S, Vartanian J-P. 2016. APOBEC3DE Antagonizes Hepatitis B Virus Restriction Factors APOBEC3F and APOBEC3G. *Journal of Molecular Biology*. 428:3514-3528. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.022>.
15. Cammack R, Atwood T, Campbell P, Parish H, Smith A, Vella F, Striling J. 2006. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Oxford Inglaterra: Oxford University Press.
16. Cantell K, Hirvonen S, Kaupplinen HL, Myllyla G. 1981. Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendai virus. *Methods in Enzymology*. 78:29-38.

17. Carlotti DN, Boulet M, Ducret J, Machicote G, Jasmin P, Reme CA, Albouy M. 2009. The use of recombinant omega interferon therapy in canine atopic dermatitis: a double-blind controlled study. *Veterinary Dermatology*. 1-7. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2009.00848.x.
18. Cheng G, Cheng W, Li Z, Yan W, Zhao X, Xie J, Liu M, Zhang H, Zhong Y, Zheng Z. 2006. Characterization of the porcine alpha interferon multigene family. *Gene*. 382:28-38. DOI: 10.1016/j.gene.2006.06.013.
19. Da Silva RC, Campos AV, Arraes LC, Cavalcanti LA, Crovella S, Lima R. 2016. TRIM5 gene polymorphisms in HIV-1-infected patients and healthy controls from Northeastern Brazil. *Immunologic Response*. DOI: 10.1007/s12026-016-8810-1.
20. De la Fuente J, Agraz A, Herrera L, Quintana M. 1996. Los interferones: un modelo para el desarrollo de la biotecnología moderna en cuba. *Biotecnología aplicada*. 13(3): 231-237.
21. De Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. 2007. Minireview: Type I Interferon Receptors: Biochemistry and Biological Functions. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(28):20053-20057.

22. Del Fresno C, Soulat D, Roth S, Blazek K, Udalova I, Sancho D, Ruland J, Ardavin C. 2013. Interferon- β Production via Dectin-1-SYK-IRF5 Signaling in Dendritic Cell Is Crucial for Immunity to *C. albicans*. *Immunity*. 38:1176-1186. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.010>.
23. Dias CCA, Moraes MP, Diaz-San Segundo F, de los Santos T, Grubman MJ. 2011. Porcine type I interferon rapidly protects swine against challenge with multiple serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 31(2):p227. DOI: <http://dx.doi.org.pbid.unam.mx:8080/10.1089/jir.2010.0055>.
24. Díaz de Arce J, Martínez JJ. 1991. Factores críticos en la producción de interferón porcino. *Revista de Salud Animal*. 13:110-113.
25. Diaz-San Segundo F, Moraes MP, de los Santos T, Dias CCA, Grubman MJ. 2010. Interferon-Induced Protection against Foot-and-Mouth Disease Virus Infection Correlates with Enhanced Tissue-Specific Innate Immune Cell Infiltration and Interferon-Stimulated Gene Expression. *Journal of Virology*. 84(4):2063-2077.

26. Ding J, Gao M, Hou G, Liang K, Yu R, Li Z, Shi Z. 2013. Stabilizing porcine interferon- α production by *Pichia pastoris* with an ethanol on-line measurement based DO-Stat glycerol feeding strategy. *J Chem Technol Biotechnol*. 89:1948-1953.
27. Dobaño C, Sedegah M, Rogers WO, Kumar S, Zheng H, Hoffman SL, Doolan DL. 2009. Plasmodium: Mammalian codon optimization of malaria plasmid DNA vaccines enhances antibody responses but not T cell responses nor protective immunity. *Experimental Parasitology*. 122(2009):112-123. DOI: 10.1016/j.xppara.2009.02.010.
28. Doly J, Civas A, Navarro S, Uze G. 1998. Type I interferons: expression and signalization. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 54:1109-1121.
29. Dörrschuck E, Fischer N, Bravo IG, Hanschmann K-M, Huiper H, Spötter A, Möller R, Cichutek K, Münk C, Tönjes RR. 2011. Restriction of Porcine Endogenous Retrovirus by Porcine APOBEC3 Cytidine Deaminases. *Journal of Virology*. 85(8):3842-3857. DOI: 10.1128/JVI.01880-10.
30. Drappier M, Michiels T. 2015. Inhibition of the OAS/RNase L pathway by viruses. *Current Opinion in Virology*. 15:19-26.

31. Du YJ, Qi J, Lu Y, Wu JQ, Yoo DQ, Liu X, Zhang XM, Li J, Sun WB, Cong XY, Shi JL, Wang JB. 2012. Evaluation of a DNA vaccine candidate co-expressing GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) with interferon alfa/gamma in immediate and long-lasting protection against HP-PRRSV challenge. *Virus Genes*. 45(3):474-487. DOI: 10.1007/s11262-012-0790-1.
32. Duun GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD. 2005. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunology*. 6(7):722-729.
33. Fang J, Wang H, Bai J, Zhang Q, Li Y, Liu F, Jiang P. 2016. Monkey Viperin Restricts Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replication. *PLoS ONE*. 11(5): e0156513.
34. FAO. 2000. *Plan Continental para la Erradicación de la Peste Porcina Clásica de las Américas*. [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/x6704s/x6704s01.htm> [Acceso: 20 enero 2015].

35. Fillela X, Molina R, Ballesta AM. 2002. Estructura y función de las citocinas. *Medicina integral*. 39(2):63-71.
36. García J, Santana Z, Zumalacárregui L, Quintana M, González D, Furrázola G, Cruz O. 2013. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor* 22(2):30-39.
37. Gélinas J-F, Clerzius G, Shaw E, Gatignol A. 2011. Replication of RNA Viruses by ADAR1 via RNA Editing and Inhibition of RNA-Activated Protein Kinase. *Journal of Virology*. 85(17):8460-8466. DOI:10.1128/JVI.00240-11.
38. GenBank [en línea, base de datos, actualización: 2016]. United States of America: National Center of Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [consulta: 06 sept 2016].
39. Gil S, Leal RO, McGahie D, Sepúlveda N, Duarte A, Niza MMRE, Tavares L. 2014. Oral Recombinant Feline Interferon-Omega as an alternative immune modulation therapy in FIV positive cats: Clinical and laboratory evaluation. *Research in Veterinary Science*. 96:79-85. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.007>.

40. Gonzalez A, Aristizabal BH, Caro E, Restrepo A, Cano LE. 2002. Production of Nitric Oxide and TNF- α , and Expression of iNOS and NF κ B in Peritoneal Macrophages Activated with Interferon Gamma. *Annual Review Biomedical Science*. 4:133-139.
41. Goujon C, Moncorgé O, Bauby H, Doyle T, Ward CC, Schaller T, Hué S, Barclay WS, Schulz R, Malim MH. 2013. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature*. 502:559-574. DOI: 10.1038/nature12542.
42. Guan J, Shahjahan SM, Wilson ZS, Erick TK, Banh C, Brossay L. 2014. Role of Type I Interferon Receptor Signaling on NK Cell Development and Functions. *PLOS ONE*. 9(10):e111302. DOI:10.1371/journal.pone.0111302.
43. Günther RA, Maurer-Forgy I, Kaiser I, Cantell K. 1990. Purification and Characterization of Natural Human Interferon. *The Journal of Biological Chemistry*. 265(16):9290-9295.
44. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*. 22(7):346-353. DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.04.006.

45. Haller O, Frese M, Kochs G. 1998. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Review Science Technology*. 17(1):220-230.
46. Haller O, Staeheli P, Kochs G. 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*. 89:812-818. DOI: 10.1016/j.biochi.2007.04.015.
47. Hao Y, Chu J, Wang Y, Zhang S, Zhuang Y. 2006. Expression and aggregation of recombinant human consensus interferon- α mutant by *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*. 28(12):905-909.
48. Harvenar-Daughton C, Kolumam GA, Murali-Kirshna K. 2006. Cutting Edge: The Direct Action of Type I IFN on CD4 T Cells Is Critical for Sustaining Clonal Expansion in Response to a Viral but Not a Bacterial Infection. *The Journal of Immunology*. 176:3315-3319. DOI: 10.4049/jimmunol.176.6.3315.
49. Hernández Guzmán K. 2014. *Desarrollo de un inmunógeno quimérico de leucin aminopeptidasa y catepsina L1 de Fasciola hepática* [tesis doctoral]. Distrito Federal, México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

50. Horisberger MA. 1992. Virus-specific effects of recombinant porcine interferon-gamma and the induction of Mx proteins in pig cells. *Journal Of Interferon Research*. 12(6):439-444. DOI: doi:10.1089/jir.1992.12.439.
<http://dx.doi.org.pbbidi.unam.mx:8080/10.1016/j.cytogfr.2014.11.003>.
51. Huang Y, Yu Y, Yang Y, Yang M, Zhou L, Huang X, Qin Q. 2016. Fish TRIM8 exerts antiviral roles through regulation of the proinflammatory factors and interferon signaling. *Fish & Shellfish Immunology*. 54:435-444. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.138>.
52. Husain b, Hesler S, Cole JL. 2015. Regulation of PKR by RNA: Formation of Active and Inactive Dimers. 2015. *Biochemistry*. 54:6663-6672.
53. Jordan LT, Debyshire JB. 1995. Antiviral action of interferon-alpha against porcine transmissible gastroenteritis virus. *Veterinary Microbiology*. 45(1995):59-70. DOI: 10.1016/0378-1135(94)00118-G.

54. Kahle T, Volkmann B, Eissmann K, Herrmann A, Schmitt S, Wittman S, Merkel L, Reuter L, Reuter N, Stamminger T, Gramberg T. 2015. TRIM19/PLM Restricts HIV Infection in a Cell Type-Dependent Manner. *Viruses*. 8(2). DOI: 10.3390/v8010002.
55. Kang R, Tang D. 2012. PKR-Dependent Inflammatory Signals. *Science Signaling*. 5(247):pe47. DOI: 10.1126/scisignal.2003511.
56. Kato G, Yamashita K, Kondo H, Hirono I. 2015. Protective efficacy and immune responses induced by a DNA vaccine encoding codon-optimized PPA1 against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in Japanese flounder. *Vaccine*. 33(2015)1040-1045. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.011>.
57. Kim S-M, Park J-H, Lee K-N, Kim S-K, You S-H, Kim T, Tark D, Lee H-S, Seo M-G, Kim B. 2015. Robust Protection against Highly Virulent Foot-and-Mouth Disease Virus in Swine by Combination Treatment with Recombinant Adenoviruses Expressing Porcine Alpha and Gamma Interferons and Multiple Small Interfering RNAs. *Journal of Virology*. 89(16):8267-8279. DOI: 10.1128/JVI.00766-15.

58. Kimman TG, Cornelissen LA, Moormann RJ, Rebel JMJ, Stockhofe-Zurwieden N. 2009. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine*. 27(28):3704-3718. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.022.
59. Kindler E, Thiel V, Weber F. 2016. Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response. *Advances in Virus Research*. 219-243. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.006>.
60. Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. 2001. Type I Interferons Potently Enhance Humoral Immunity and Can Promote Isotype Switching by Stimulating Dendritic Cells In Vivo. *Immunity*. 14:461-470.
61. Le Bon A, Tough DF. 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Current Opinion in Immunology*. 14:432-436.
62. Lee S, Weon S, Lee S, Kang C. 2010. Relative Codon Adaptation Index, a Sensitive Measure of Codon Usage Bias. *Evolutionary Bioinformatics*. 6(2010):47-55.

- 63.Li NN, Liu P, Chen SJ, Lin QP, Zhou LF, Zhang SQ. 2010. Construction and expression of a novel bioactive IFN- α 2b/CM4 fusion protein in *Escherichia coli*. *Microbiol Res.* 165(2):116-121.
- 64.Li Y, Chang H, Yang X, Zhao Y, Chen L, Wang X, Liu H, Wang C, Zhao J. 2015. Antiviral Activity of Porcine Interferon Regulatory Factor 1 against Swine Viruses in Cell Culture. *Viruses.* 7(2015):5908-5918. DOI: 10.3390/v7112913.
- 65.Lindenmann J. 2007. How to Chase a Red Herring and Come up with a Smallmouth Bass. En Pitha PM (Ed.) *Interferon: The 50th Anniversary*. Blatimore, MD, USA. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 316:3-7.
- 66.Liu Z, Sun Y, Feng T, Ji Q, Cong P, Chen Y, He Z. 2014. Mammalian expression levels of cellulose and xylanase genes optimised by human codon usage are not necessarily higher than those optimised by the extremely biased approach. *Biotechnology Letters.* 36:2169-2176. DOI: 10.1007/s10529-014-1592-4.
- 67.Lu J, Pan Q, Rong L, Liu S-L, Liang C. 2011. The IFITM Proteins Inhibit HIV-1 Infection. *Journal of virology.* 85(5):2126-2137. DOI: 10.1128/JVI.01531-10.

68. Ma S-J, Li K, Li X-S, Guo X-Q, Fu P-F, Yang M-F, Chen H-Y. 2014. Expression of bioactive porcine interferon-alpha in *Lactobacillus casei*. *World J Microbiol Biotechnol*. 30:2379-2386.
69. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Gara A. 2015. Type I interferons in infectious disease. *Nature reviews: Immunology*. 15:87-103. DOI: 10.1038/nri3787.
70. Mirzahoseini H, Mafakheri S, Mohammadi NS, Enayati S, Mortazavidehkordi N. 2011. Heterologous Proteins Production in *Escherichia coli*: An Investigation on the Effect of Codon Usage and Expression Host Optimization. *Cell Journal (Yakhteh)*. 12(4):453-458.
71. Miyatake H, Kanto T, Inoue M, Sakakibara M, Kaimori A, Yakushijin T, Itose I, Miyazaki M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. 2006. Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th 1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*. 14:404-412.
72. Montal M. 2009. Vpu MARCHMAKERS as a Therapeutic Strategy for HIV Infection. *PloS Pathogen*. 5(5):e1000246. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000246.

73. Montaña Estrada LF, Rendón Huerta EP. 2016. Citocinas. En: Pavón Romero L, Jiménez Martínez MC, Garcés Álvarez ME. *Inmunología molecular, celular y traslacional*. Barcelona, España: Wolters Kluwer. 15:258-297.
74. Muñoz-Moreno R, Cuesta-Geijo MÁ, Martínez-Romero C, Barrado-Gil L, Galindo I, García-Sastre A, Alonso C. 2016. Antiviral Role of IFITM Proteins in African Swine Fever Virus Infection. *PLoS ONE*. 11(4): e0154366. DOI: 10.1371/journal.
75. Narum DL, Kumar S, Rogers WO, Fuhrmann SR, Liang H, Oakley M, Taye A, Sim BKL, Hoffman S. 2001. Codon Optimization of Gene Fragments Encoding Plasmodium falciparum Merzoite Proteins Enhances DNA Vaccine Protein Expression and Immunogenicity in Mice. *Infection and Immunity*. 60(12):7250-753. DOI: 10.1128/IAI.69.12.7250-7253.2001.
76. Paolini R, Bernardini G, Molfetta R, Santoni A. 2015. NK cells and interferons. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 26(2):113-120. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.11.003>.

77. Pérez-Sancho M, Durán-Ferrer M, García-Seco T, Macías P, García N, Martínez I, Ruiz E, Legaz E, Diez-Guerrier A, González S, Domínguez L, Álvarez J. 2014. Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 160:123-128.
78. Pestka S. 2007. The interferons: 50 years after their Discovery, there is much more to learn. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(28):20047-20051. DOI: 10.1074/jbc.R700004200.
79. Pham AM, Santa Maria FG, Lahiri T, Friedman E, Marié IJ, Levy DE. 2016. PKR Transduces MDA5-Dependent Signals for Type I IFN Induction. *PLoS Pathogens*. 12(3):e1005489. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005489.
80. Pitha PM, Kunzi MS. 2007. Type I Interferon: The Ever Unfolding Story. En: Pitha PM (Ed.). *Interferon: The 50th Anniversary*. Blatimore, MD, USA. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 316:41-70.

81. Pol HMA, Broekhuysen-Davies JM, Wagenaar F, La Bonnardiere C. 1991. The influence of porcine recombinant interferon- α 1 on pseudorabies virus infection of porcine nasal mucosa in vitro. *Journal of General Virology*. 72(4):933-938. DOI: 10.1099/0022-1317-72-4-933.pone.0154366
82. Prchal M, Pilz A, Simma O, Lingnau K, von Gabain A, Strobl B, Müller M, Decker T. 2009. Type I interferons as mediators of immune adjuvants for T- and B cell-dependent acquired immunity. *Vaccine*. 275:G17-G20. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.10.016.
83. Puigbo P, Bravo IG, Garcia-Vallve S. 2008. CAIcaI: A combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biology Direct*. 3:38. DOI: 10.1186/1745-6150-3-38.
84. Puigbo P, Guzmán E, Romeu A, Garcia-Vallvé S. 2007. OPTIMIZAR: a web server for optimizing the codón usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 35:126-131.
85. Ranjbar MM, Gupta SK, Ghorban K, Nabian S, Sazmand A, Taheri M, Esfandyari S, Taheri M. 2015. Designing and Modeling of Complex DNA Vaccine Based on Tropomyosin Protein of *Boophilus* Genus Tick. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 175(1):323-339. DOI: 10.1007/s12010-014-1245-z.

86. Renukaradhya GJ, Meng XJ, Calvert JG, Roof M, Lager KM. 2015. Live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Current status and future direction. *Vaccine*. 33(33):4069-4080. DOI: <http://dx.doi.org.pbid.unam.mx:8080/10.1016/j.vaccine.2015.06.092>.
87. Ritz S, Egberink H, Hartmann K. 2007. Effect of feline interferon-omega on the survival time and quality of life of cats with feline infectious peritonitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 21:1193-1197.
88. Rizza P, Moretti F, Capone I, Belardelli. 2014. Role of type I interferon in inducing a protective immune response: Perspectives for clinical applications. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 26:195-201.
89. Rosano GL, Ceccarelli EA. 2009. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microbial Cell Factories*. 8(2009):41. DOI: <http://www.microbialcellfactories.com/content/8/1/41>.
90. Salter JD, Bennett RP, Harold CS. 2016. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends in Biochemical Sciences*. 41(7):578-594. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2016.05.001> .

91. Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Volumen 1. Tercera edición. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
92. Sánchez González A, Becerril García MA. 2016. Respuesta inmunológica a virus. En: Pavón Romero L, Jiménez Martínez MC, Garcés Alvarez ME (eds.) *Inmunología molecular, celular y traslacional*. Barcelona, España: Wolters Kluwer. 24:448-471.
93. Sang Y, Rowland RR, Hesse RA, Blecha F. 2010. Differential expression and activity of the porcine type I interferon family. *Physiological Genomics*. 42:248-258. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00198.2009.
94. Sang Y, Rowland RRR, Blecha F. 2011. Porcine type I interferons: polymorphic sequences and activity against PRRSV. *Networked Digital Library of Theses & Dissertations*. 5(4):S8. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S4-S8.
95. Saugandhika S, Sharma V, Malik H, Saini S, Bag S, Kumar S, Singh NK, Mohanty AK, Malakar D. 2015. Expression and purification of buffalo interferon-tau for invitro embryo development. *Cytokine*. 75:186-196. DOI: <http://dx.doi.org.pbidi.unam.mx:8080/10.1016/j.cyto.2015.03.012>.

96. Schneider WM, Dittmann Chevillotte M, Rice CM. 2014. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology*. 32:513-545.
97. Sei-Ichi K, Tomohiro I, Kei-Ichi M, Satoru K, Yosuke M, Hiromichi O. 2015. Cellular immune response to interferon- τ in peripheral blood mononuclear cells of Japanese black cattle with bovine leukemia virus infection. *Acta Veterinaria-Beograd*. 65(2):287-296.
98. Shi H, Fu Q, Ren Y, Wang D, Qiao J, Wang P, Zhang H, Chen C. 2015. Both Foot-and-Mouth Disease Virus and Bovine Viral Diarrhea Virus Replication are Inhibited by Mx1 Protein Originated from Porcine. *Animal Biotechnology*. 26:73-79. DOI: 10.1080/10495398.2014.902850.
99. Si Z, Vandegraaff N, O'hUigin C, Byeongwoon S, Yuan W, Xu C, Perron M, Li X, Marasco WA, Engelman A, Dean M, Sodroski J. 2006. Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection. *PNAS*. 103(19):7454-7459. DOI: 10.1073/pnas.0600771103.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0600771103

100. Sinclair JA, Dawson KL, Buddle BM. 2016. The effectiveness of parallel gamma-interferon testing in New Zealand's bovine tuberculosis eradication programme. *Preventive Veterinary Medicine*. 127:94-99. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2016.03.020.
101. Sinigaglia F, D'Ambrosio D, Rogge L. 1999. Type I interferons and the Th1/Th2 paradigm. *Developmental and Comparative Immunology*. 23:657-663.
102. Stackaruk ML, Lee AJ, Ashkar AA. 2013. Type I interferon regulation of natural killer cell function in primary and secondary infections. *Expert Review of Vaccines*. 12(8):875. DOI: <http://dx.doi.org.pbidi.unam.mx:8080/10.1586/14760584.2013.814871>.
103. Takaoka A, Yanal H. 2006. Interferon signalling network in innate defence. *Cellular Microbiology*. 8(6):907-922. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00716.x.
104. Tizard IR. 2009. *Introducción a la inmunología veterinaria*. Octava edición. España: Elsevier.
105. Tovey MG, Lallemand C, Thyphronitis G. 2008. Adjuvant activity of type I interferons. *Biol. Chem*. 389: 541-545.

106. Vacaflorés A, Chapman NM, Harty JT, Richer MJ, Houtman JCD. 2016. Exposure of Human CD4 T Cell to IL-12 Results in Enhanced TCR-Induced Cytokine Production, Altered TCR Signaling, and Increased Oxidative Metabolism. *PLoS ONE*. 11(6):e0157175. DOI: 10.1371/journal.pone.0157175.
107. Wang H, Bai J, Fan B, Li Y, Zhang Q, Jiang P. 2015. The Interferon-Induced Mx2 Inhibits Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replication. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 36(2):129-139.
108. Wang R, Zhang Y-J. 2014. Antagonizing Interferon-Mediated Immune Response by Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *BioMed Research International*. 2014. Article ID 315470. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/315470> [consulta: 08 sept 2016].
109. Wang X, Li C, Zhou L, Zhang N, Wang X, Ge X, Guo X, Yang H. 2014. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus counteracts the porcine intrinsic virus restriction factors-IFITM1 and Tetherin in MARC-145 cells. *Virus Research*. 191:92-100. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.025>.

110. Wang X, Marthaler D, Rovira A, Rossow S, Murtaugh MP. 2015. Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vaccinated herds in the United States. *Virus Research*. 210(2):34-41. DOI: <http://dx.doi.org.pbid.unam.mx:8080/10.1016/j.virusres.2015.07.004>.
111. Wang YB, Wang ZY, Chen HY, Cui BA, Zhang HY, Wang R. 2009. Secretory expression of porcine interferon-gamma in baculovirus using HBM signal peptide and its inhibition activity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 132(2-4):314-317.
112. Weins KE, Ernst JD. 2016. The Mechanism for Type I Interferon Induction by *Mycobacterium tuberculosis* is Bacterial Strain-Dependent. *PLoS Pathogen*. 12(8):e1005809. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005809.
113. Weston S, Czieso S, White IJ, Smith SE, Wash RS, Diaz-Soria C, Kellam P, Marsh M. 2016. Alphavirus Restriction by IFITM Proteins. *Traffic*. 17:997-1013.
114. Wilkins J, Zheng Y-M, Yu J, Liang C, Liu S-L. 2016. Nonhuman Primate IFITM Proteins Are Potent Inhibitors of HIV and SIV. *PLoS ONE*. 11(16): e0156739. DOI: 10.1371/journal.pone.0156739.

115. Wu QH, Brum MCS, Caron L, Koster M, Grubman MJ. 2013. Adenovirus-mediated type I interferon expression delays and reduces disease signs in cattle challenged with foot-and-mouth disease virus. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 23(7):359-368.
116. Xu Z, Shan F, Shan F, Meng C, Xie X, Liu J, Min J, Chen X, Jiao X. 2015. Development of an interferon-gamma ELISPOT for bovine tuberculosis. *Chinese Journal of Biotechnology*. 31(2):183-194.
117. Yim HCH, Wang D, Yu L, White CL, Faber PW, Williams BRG, Sadler AJ. 2016. The kinase activity of PKR represses inflammasome activity. *Cell Research*. 26:367-379.
118. Young AS, Cummins JM. 1990. The history of interferon and its use in animal therapy. *East African Medical Journal*. 67(7 sup. 2):SS31-63.
119. Zhang F, Goatley L, Abrams CC, Chapman D, Netherton CL, Takamatsu H-H, Dixon LK. 2013. 208: Understanding the mechanisms of interferon induction by a large DNA virus and its application to vaccine development. *Cytokine*. 63(3):292. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.06.211.

120. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 7(1-2):203-14.
121. Zhou X, Song Z, Liu X, Jia F, Wang Y. 2011. Production of Recombinant Porcine Interferon alpha Using PHB-Intein-Mediated Protein Purification Strategy. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 163(8):981-993. DOI: 10.1007/s12010-010-9101-2.
122. Zuniga EI, Hahm B, Oldstone MBA. 2007. Type I Interferon During Viral Infections: Multiple Triggers for a Multifunctional Mediator. En Pitha PM (Ed.). *Interferon: The 50th Anniversary.* Blatimore, MD, USA. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 316:337-357.
123. Zürcher T, Pavlovic J, Staeheli P. 1992. Mechanism of human MxA protein action: variants with changed antiviral properties. *The EMBO Journal.* 11(4):1657-1661.
124. Züst R, Toh Y-X, Valdés I, Cerny D, Heinrich J, Hermida L, Marcos E, Guillén G, Kalinke U, Shi P-Y, Fink K. 2013. *Journal of Virology.* 88(13):7276-7285. DOI: 10.1128/JVI.03827-13.