



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

CONSTRUCCIÓN Y EMPAQUETAMIENTO DEL GEN DE
INTERFERÓN ALFA AVIAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

LUIS EDUARDO JIMÉNEZ MARTÍNEZ

Asesores:

MVZ, Dr. José Alberto Cano Buendía
MVZ, Dr. Jaime Campuzano Granados
MVZ, Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A mi padres Raymundo Jiménez García y María Claudia Marina Martínez Martínez, por su apoyo y amor incondicional que los hacen dignos de tal título.

A mis Hermanos: Oscar, Paulina y Mariana.

A mi novia y mejor amiga: Ana Fernanda.

A mis amigos Xalapeños: Roberto, Iván, Xavier, César, Jesús, Armando, Sergio, Hazael, Ismar, Alfredo, Wendo, Julio, Ángel, Chespi

A mis amigos de la Facultad: Jahaziel, Francisco, David, Luis Poch, Luis Ángel, Carlos Vilchis, Anhet, Viviana, Alejandra y Diego.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Yadira, Enrique, Lázaro, Nina, Isa, Jocelyn, Adolfo, Silvia, Victor, Ana Gabriela, Naomi, Yordy, Miguel, Susana, Andrés, Lilitiana y Jamil.

Agradecimientos

Al Departamento de Microbiología e inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A los Doctores José Alberto Cano Buendía, Jaime Campuzano Granados y Norma Leticia Calderón Apodaca, por abrirme las puertas para realizar este proyecto y por las asesorías y apoyo brindados durante el mismo.

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento para realizar el proyecto IN217416.

A los miembros del Jurado por su amable atención para corregir este documento:

Presidente: Néstor Ledesma Martínez

Vocal: Laura Cobos Marín

Secretario: Rubén Merino Guzmán

Suplente: Pablo Hernández Peralta

Suplente: Jaime Campuzano Granados

Contenido

1. Introducción	2
1.1 Terapia génica.....	3
1.2 Optimización de codones	3
1.3 Empaquetamiento con Quitosano.....	5
1.4 Adyuvantes	6
1.4.1 Citocinas como adyuvantes	7
1.5 Interferón.....	7
1.5.1 Inducción del interferón de tipo I.....	8
1.5.2 Señalización del interferón de tipo I.....	9
1.5.3 Genes estimulados por el interferón alfa de pollo.....	10
1.5.4 Interferón recombinante de uso comercial en Medicina Veterinaria	12
2. Justificación	13
3. Hipótesis.....	14
4. Objetivos	15
4.1 Objetivo General	15
4.2 Objetivos Particulares	15
5. Material y Métodos.....	16
5.1 Análisis de la secuencia.....	16
5.2 Optimización de la secuencia, construcción y clonación del gen.	16
5.3 Transformación de pCR IFNChika en <i>E. coli</i> TG1 químicamente competentes.....	16
5.4 Propagación y purificación del plásmido pCR IFNChika	18

5.5 Digestión de pCR IFNChika con NotI y Apal.....	20
5.6 Electroforesis en gel de agarosa y purificación de las bandas.....	20
5.7 Reacción de ligazón en vector de expresión de células eucariotas	21
5.8 Análisis de secuencia de la construcción	22
5.9 Empaquetamiento con Quitosano	22
5.10 Digestión con quitosanasa y protección contra DNAsas.....	23
6. Resultados	25
6.1 Análisis de las secuencias.....	25
6.2 Clonación en el vector pCRII-TOPO.....	26
6.3 Doble digestión de pCR IFNChika y subclonación en el vector de expresión para células eucariontes pcDNA3.1 myc/His A	27
6.4 Secuenciación	30
6.5 Empaquetamiento con quitosano, digestión con quitosanasa y protección contra DNAsa	30
7. Discusión.....	32
8. Conclusiones	35
9. Prospectivas	36
Anexo 1. Medios y Reactivos.....	37
Referencias	39

Índice de figuras

Fig.1 Inducción del interferón y establecimiento de un estado antiviral en una célula de pollo..	11
Fig.2 Secuencia original del gen de interferón alfa aviar.	25
Fig.3 Secuencia optimizada del gen de interferón alfa aviar.	26
Fig.4 Mapa del vector pCR con el gen de interferón alfa aviar optimizado.	26
Fig.5 A) Ensayo <i>in silico</i> de la digestión con Apa I y Not I de pCR IFNChika y B) Electroforesis en gel de agarosa de la doble digestión de pCR IFNChika.....	27
Fig.6 A) Ensayo <i>in silico</i> de la doble digestión de pcDNA3.1 myc/His A y B) Electroforesis en gel de agarosa de la doble digestión de pcDNA 3.1 myc/His A.....	28
Fig.7 Mapa de la construcción pcDNA Alfa.	29
Fig.8 Transformación de <i>E.coli</i> TG1.....	30
Fig.9 Liberación del ADN con quitosanasasa y protección contra DNAsa.	31

Índice de cuadros

Cuadro 1 Cantidades y constantes de reacción para la digestión con NotI **Error! Bookmark not defined.**

Cuadro 2 Cantidades y constantes de reacción para la digestión con ApaI.... **Error! Bookmark not defined.**

Cuadro 3 Cantidades y constantes de reacción para la ligazón con T4 DNA Ligasa**Error! Bookmark not defined.**

Cuadro 4. Cantidades y constantes de reacción para la digestión con DNAsa.....23

Abreviaturas

CaCl₂	Cloruro de Calcio
ChIFN α	Interferón alfa del pollo
ChIFN β	Interferón beta del pollo
ChIFN γ	Interferón gamma del pollo
ChIL-2	Interleucina-2 del pollo
ChIL-12	Interleucina-12 del pollo
CO₂	Dióxido de Carbono
dsRNA	Ácido Ribonucleico de doble cadena
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
eIF-2α	Factor de iniciación de la traducción eucariota 2 α
FC	Fracción cristalizable del anticuerpo
<i>g</i>	Gravedades
H9N2	Subtipo de influenza Hemaglutinina ⁹ ,Neuroaminidasa ²
IFN α	Interferón alfa
IFN β	Interferón beta
IFN γ	Interferón gamma
IFN ω	Interferón omega
IFNAR 1	Receptor de interferón 1
IFNAR 2	Receptor de interferón 2

IKK alfa	Inhibidor alfa de la cinasa NF-Kappaβ
IKK beta	Inhibidor beta de la cinasa NF-Kappaβ
IKK épsilon	Inhibidor épsilon de la cinasa NF-Kappaβ
IL-1	Interleucina-1
IL-1B	Interleucina-1B
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-12	Interleucina-12
IL-18	Interleucina-18
IRF 3	Factor regulador de interferón 3
IRF 7	Factor regulador de interferón 7
ISG´s	Genes estimulados por interferón
ISRE´s	Elementos de respuesta estimulados por Interferón
Jak	Cinasa Janus
KDa	Kilodaltons
LB	Caldo Luria
MAVS	Proteína mitocondrial de señalización antiviral
MDA5	Antígeno de diferenciación mieloide
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
MHC I	Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero

Mx	Proteína de resistencia a Myxovirus
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88
Na₂SO₄	Sulfato de Sodio
NF-kappa β	Factor Nuclear Kappa Beta
NK	Natural Killer
OAS	Oligoadenilato sintetasa
OD₆₀₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
PAMP´s	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
pb	Pares de bases
PKR	Proteíncinasa
PRR´s	Receptores de Reconocimiento de PAMP´s
RIG-1	Gen inducido por ácido retinoico
rpm	Revoluciones por minuto
ssRNA	Ácido ribonucleico de cadena sencilla
STAT	Transductor de señales y activador de la transducción
TBE	Tris-Borato- EDTA
TBK1	Cinasa de unión a TANK-1
TLR 3	Receptor de tipo toll-3
TLR 7	Receptor de tipo toll-7
TNF	Factor de necrosis tumoral

TRAF 2	Factor-2 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRAF 3	Factor-3 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRAF 5	Factor-5 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRAF 6	Factor-6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRIF	Proteína adaptadora con dominio TIR, inductora de IFN- β
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
VLP's	Partículas parecidas a virus

RESUMEN

JIMÉNEZ MARTÍNEZ LUIS EDUARDO. Construcción y empaquetamiento del gen de interferón alfa aviar (bajo la dirección de: MVZ, Dr. José Alberto Cano Buendía; MVZ, Dr. Jaime Campuzano Granados y MVZ, Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca).

El presente trabajo comprende la subclonación del gen de interferón alfa aviar optimizado en el vector de expresión para células eucariontes pcDNA 3.1 myc/ His A y su posterior empaquetamiento con quitosano en una relación de 4:1 (Quitosano:ADN) mediante un proceso de coacervación.

Se demostró que con esta relación el ADN queda totalmente envuelto por el quitosano y que es protegido de la acción de ADNasas.

Como prospectivas de este trabajo se espera la transfección en células eucariontes del plásmido que contiene al interferón empaquetado con diferentes cantidades de quitosano y la evaluación de la integridad de las partículas DNA-Quitosano almacenadas a diferentes condiciones de tiempo y temperatura.

1. Introducción

Los alimentos de origen avícola son de suma importancia para la alimentación de la sociedad debido a que la carne de pollo normalmente es la más barata de todas las procedentes del ganado doméstico. La carne de pollo es saludable, tiene un bajo contenido de grasas totales y de ácidos grasos trans; mientras que el contenido de las grasas monoinsaturadas constituye aproximadamente la mitad del total de grasas (1).

El huevo por su parte contiene la mayoría de los aminoácidos esenciales, gran cantidad de calcio, fósforo, magnesio, hierro, zinc, vitamina A y el complejo vitamínico B (2).

Debido a estas bondades los productos avícolas son alimentos muy demandados para satisfacer las necesidades de alimentación de la población humana. Por lo tanto, se han creado diversos sistemas de producción para obtener los productos avícolas en cantidad y calidad suficiente para poder satisfacer la demanda de carne y huevo.

Para el 2018 se estimó una producción de carne de pollo de 3.9 millones de toneladas, mientras que para el huevo fue de más de 2.8 millones de toneladas. La producción de pollo en México ha crecido 145% durante el periodo de 1994 a 2017, ha aumentado a un ritmo de crecimiento anual de 0.4%. En el plano internacional, ocupa el sexto lugar en producción de pollo y el cuarto en producción de huevo (3).

Sin embargo, la producción avícola se ve deteriorada de forma importante cuando las granjas son afectadas por infecciones virales, en las que se tienen pérdidas del 15 al 20% del total de aves en un brote de influenza (4). Otros virus que afectan a las aves son: 1) El virus de la bronquitis infecciosa, que es capaz de inducir daño renal, respiratorio y baja en la producción de huevo asociada con la disminución en la calidad de huevo(5); 2) El virus de la enfermedad de Newcastle, enfermedad altamente contagiosa, puede causar 50% de mortalidad (cepas muy virulentas), enfermedad respiratoria, reducción en la producción de huevo y baja

mortalidad (cepas virulentas) e infecciones secundarias (cepas de baja virulencia); 3) Influenza Aviar, la cual puede ser de baja o de alta patogenicidad, genera cese de la postura de huevo, signos de enfermedad respiratoria, digestiva y nerviosa, hasta la muerte con las cepas de alta patogenicidad (6).

1.1 Terapia génica

La terapia génica usa la ingeniería genética para introducir o eliminar genes específicos, alterar o suplementar la acción de un gen anormal, reparar o introducir una copia normal o uno que añada nuevas funciones o regule la actividad de otros genes.

La terapia génica somática se basa en la transferencia de material genético a células somáticas como forma alternativa de tratamiento para mejorar la salud de las personas o de los animales. Puede ser la introducción de ADN o ARN, o la introducción de células cuyo material genético ha sido modificado. La transferencia de un gen se puede lograr de varias formas, ya sea con un vector viral o mediante métodos físicos o químicos, como la transmisión directa de ADN o de complejos de ADN como liposomas, conjugados moleculares o policones.

Un tipo de enfermedades a las que puede ir dirigida la terapia génica son las infecciosas. Para estas, las estrategias consisten en obtener vacunas, introducir genes que obstaculicen la replicación del virus, activar el sistema inmune, impedir que el virus infecte a células sanas, introducir genes que produzcan ribozimas que degraden el ARN viral y expresar genes que provean protección a las células para no ser infectadas (7,8).

Muchos de estos productos son vacunas de subunidades de microorganismos los cuales pueden mejorar su eficacia con el uso de un adyuvante.

1.2 Optimización de codones

Los genes utilizados en la terapia génica pueden ser sometidos a una optimización de codones, la cual es definida como la ingeniería de diseño genético, mediante la que se intercambian algunos codones sin alterar la secuencia de aminoácidos de

las proteínas para las cuales codifican (9). Cada secuencia proteica está compuesta de 20 aminoácidos; existen 64 codones que consisten en 3 de paro y 61 que codifican para estos 20 aminoácidos (10). Un codón consta de tres nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico y que codifica para un solo aminoácido. Sólo unos pocos aminoácidos son codificados por un simple codón. La mayoría de los aminoácidos son codificados por 2 a 6 codones, lo que complica la decodificación al permitir que más de un codón codifique un solo residuo de aminoácido en la proteína. Esta parte del código genético es referida como degeneración de codones. Los codones sinónimos son codones diferentes que codifican para el mismo aminoácido (11). Numerosos estudios han demostrado que el uso de codones sinónimo es un proceso no-aleatorio (11,12). Por ejemplo, la alanina puede ser codificada por cualquiera de los cuatro codones, GCC, GCG, GCU y GCA, mientras la fenilalanina puede ser codificada por sólo dos, UUU y UUC, y la leucina por seis: CUA, CUC, CUG, CUU, UUA y UUG. El uso de codones significa el uso no aleatorio de estos en el mRNA. La utilización de codones en numerosos organismos ha sido cuantificada con diferentes cálculos, incluida la frecuencia del uso de codones sinónimo relativo (13), el índice de preferencia de codones (14), el uso de codones óptimos (15), y el índice de adaptación de codones (16), los cuales indican diferencias en la frecuencia de codones sinónimo en el DNA codificado. Para los genes altamente expresados en *E. coli* y levaduras, el uso de codones sinónimo no aleatorios está relacionado con la abundancia de tRNA. Como la mayoría de aminoácidos son codificados por más de un codón, los programas de optimización de codones evitan el uso de codones raros (17). La expresión de proteínas y la preferencia de codones están ligadas, por lo tanto, la expresión puede ser mejorada al imitar los patrones de preferencia de codones de mRNA altamente expresados. Para maximizar la expresión de proteínas en organismos vivos, la optimización de codones es usada para mejorar la eficiencia de traducción de los genes objetivo y convertir las secuencias de nucleótidos del DNA de una especie en la secuencia de nucleótidos de DNA de otra especie.

1.3 Empaquetamiento con Quitosano

El quitosano es un transportador génico perteneciente a los vectores no virales. Es un polisacárido biodegradable, polímero de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina (18), obtenido por la desacetilación alcalina de la quitina, la cual es un polisacárido encontrado en el exoesqueleto de crustáceos, artrópodos marinos e insectos (19). Como el único polisacárido natural con una carga positiva, el quitosano tiene las siguientes propiedades únicas como transportador para la terapia génica: es seguro y no tóxico, tanto en animales experimentales (20) como en humanos (21); puede ser degradado en H₂O y CO₂ en el cuerpo, lo que asegura su bioseguridad; es biocompatible con el cuerpo humano y no provoca la estimulación de la mucosa y la dermis; su naturaleza polielectrolítica catiónica provee una fuerte interacción electrostática con el DNA cargado negativamente (22) y protege al DNA de la degradación por nucleasas (23). La propiedad mucoadhesiva del quitosano potencialmente permite una interacción prolongada entre la macromolécula liberada y la membrana epitelial, lo que promueve una absorción más eficiente (24). Debido a estas características las nanopartículas de quitosano han sido particularmente atractivas como vector génico en años recientes.

En la terapia génica, la transfección celular presenta algunos inconvenientes, como la dirección del sistema de liberación hacia la célula blanco, el transporte a través de la membrana, la degradación en los endolisosomas, y el tráfico intracelular del DNA plasmídico hacia el núcleo (25). Los complejos DNA-quitosano parecen tener la habilidad de sobrepasar tres obstáculos para la transfección : la absorción celular, la liberación endosomal y la localización nuclear (26). Sin embargo, el quitosano ha mostrado tener una alta eficiencia de transfección (27) y ha sido exitosamente usado como un sistema no viral de liberación génica tanto *in vitro* (28) como *in vivo* (29).

1.4 Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias agregadas a las vacunas para mejorar la inmunogenicidad de antígenos altamente purificados que tienen capacidad inmunoestimuladora insuficiente (30).

Uno de los primeros adyuvantes descubiertos fueron los de aluminio, los cuales principalmente incrementan la producción de anticuerpos (31). Otro tipo es el adyuvante incompleto de Freund, el cual fue considerado muy reactivo para su uso continuo en humanos. Los adyuvantes han sido usado por más de 90 años y son componentes recurrentes de más de 30 vacunas licenciadas de diferentes fabricantes para uso humano (30).

No todas las vacunas necesitan adyuvantes. Las vacunas con agentes atenuados son efectivas debido a que producen una infección leve en los individuos y una respuesta inmune que es similar a la inducida por la infección con las cepas silvestres: estas vacunas son capaces de iniciar una respuesta inmune innata, la cual lleva a una respuesta adaptativa subsecuente que conduce a la eliminación del patógeno. Algunas vacunas inactivadas han sido exitosas debido a que contienen una mezcla heterogénea de diversos antígenos y otros componentes patógenos que actúan como adyuvantes intrínsecos. Sin embargo, muchas de ellas necesitan de adyuvantes y de varias dosis de refuerzo para obtener una protección a largo plazo (32).

Algunos adyuvantes pueden actuar como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's), desencadenan varias vías de señalización que resultan en la inducción de genes que codifican citocinas, quimiocinas, y moléculas coestimuladoras las cuales tienen una participación importante en la activación, expansión y polarización de la respuesta inmune con lo cual los componentes de la vacuna son identificados como una amenaza y puede ocurrir la activación y maduración de células presentadoras de antígeno y el inicio de la respuesta inmune adaptativa (33).

Debido a que varias citocinas participan en la respuesta inmune, podrían funcionar como complemento de varias vacunas, como se ha demostrado en diversos estudios que evalúan su habilidad para aumentar la respuesta inmune dirigida contra antígenos específicos (34).

1.4.1 Citocinas como adyuvantes

El uso de citocinas recombinantes atrae atención y puede ser una alternativa al uso de los adyuvantes existentes. Las citocinas son proteínas que juegan un papel crucial para regular el sistema inmune, y se producen en respuesta a una gran variedad de enfermedades infecciosas y no infecciosas. En animales, proveen señales que ayudan a dirigir la respuesta inmune ya sea mediada por anticuerpos o por células (35,36). En diferentes trabajos, se ha demostrado que las citocinas son excelentes adyuvantes (34,37).

En aves, particularmente en los pollos se han examinado algunas citocinas para su uso potencial como adyuvantes en vacunas, entre las que destacan la Interleucina-1 β (IL-1 β) que incrementa la producción de anticuerpos cuando se administra *in vivo* como una proteína recombinante comparada con el antígeno solo (38); la Interleucina de pollo-2 (ChIL-2) mejora la activación de células T y su proliferación (39); el interferón gamma de pollo (ChIFN- γ) incrementa la respuesta secundaria de anticuerpos (40); la ChIL-12 mejora la producción de anticuerpos séricos neutralizantes contra el virus de la bursitis infecciosa cuando se administra junto con un antígeno del virus, además de que estimula la producción de IFN- γ (41). Por último el ChIFN- α ha demostrado tener actividad antiviral contra el virus de Newcastle (42).

1.5 Interferón

El interferón tipo I fue la primera citocina descubierta en pollos, la cual es inducida en la membrana corioalantoidea del embrión por el virus de la influenza inactivado por calor. Fue nombrado interferón por su habilidad para interferir directamente con la replicación del virus de la influenza (43). En tanto, el interferón alfa del pollo (ChIFN- α) y el interferón beta del pollo (ChIFN- β) son interferones tipo I del pollo y

comparten características funcionales y estructurales parecidas a las de los interferones alfa y beta de mamíferos (44).

1.5.1 Inducción del interferón de tipo I

En las células eucariotas existen receptores que son específicos para el reconocimiento de estructuras conservadas en organismos patógenos. Existen 3 clases de receptores de ácidos nucleicos asociados con la activación de las vías de interferón. La primera categoría de receptores de reconocimiento de patrones es la familia de las helicasas parecidas al gen inducible del ácido retinoico I (RLH), la cual incluye el gen inducible del ácido retinoico I (RIG-I) y el gen asociado a la diferenciación de melanoma 5 (MDA5) (45). La segunda es la familia de los receptores tipo *toll* (TLR) que incluyen TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, los cuales identifican PAMP's endosomales, fagosomales o extracelulares (46). La tercera es la familia de los sensores de DNA, la cual incluye la sintetasa de GMP-AMP cíclico (47). Al activarse, estos PRR's reclutan moléculas de señalización y resultan, directa o indirectamente, en la activación de factores reguladores de interferón 3 (IRF3) y 7 (IRF7), así como los factores de transcripción, proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear Kappa Beta (NF- κ B) (45–48), los cuales inician la transcripción de los genes de interferón de tipo I. Algunos PAMP's virales son, el RNA de doble cadena (dsRNA), el cual es reconocido por el receptor de tipo *toll* 3 (TLR3) en el endosoma, también es reconocido por RIG-I y por MDA5 en el citoplasma (49). De igual manera, el RNA de cadena simple (ssRNA) puede actuar como un PAMP, el TLR7 reconoce en el endosoma al ssRNA rico en Guanina y Uracilo (50).

Las aves carecen del gen RIG-I y se ha propuesto que el MDA5 cumple las funciones de RIG-I (51). De igual manera, los pollos también carecen del TLR9, que funciona como sensor de DNA viral, y en su lugar tienen el TLR21 que es su ortólogo funcional (52).

Las vías de señalización que se utilicen para la activación de los promotores de genes antivirales dependen del receptor al que se unen. El TLR3 endosomal acopla los adaptadores intracelulares TRIF (proteína adaptadora con dominio TIR

inductora de IFN-beta) y TRAF3 (Factor 3 asociado al receptor del Factor de Necrosis Tumoral) para activar las cinasas TBK1 (Cinasa 1 de unión a TANK) e IKKepsilon (inhibidor epsilon de la cinasa NF-kB). En seguida las cinasas TBK1 e IKKepsilon fosforilan a IRF7 (Factor regulador de interferón 7), un factor de transcripción que activa genes para interferón y otras citocinas inmunoreguladoras. En contraste la señalización por TLR7, requiere de proteínas adaptadoras MyD88 (proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88) y TRAF3 para encauzar a la cinasa IKKalpha. Esta cinasa fosforila a IRF7. TLR7/MyD88 también recluta a la proteína adaptadora TRAF6 que eventualmente activa el factor de transcripción NF-kB vía las cinasas IKKalpha e IKKbeta. NF-kB conduce la transcripción de genes para citocinas proinflamatorias pero también mejora la expresión del gen de interferón (53).

En el citoplasma, la detección del RNA se da por MDA5 el cual activa la proteína adaptadora MAVS (Proteína mitocondrial de señalización antiviral) que utiliza varios TRAFs (TRAF2, 3, 5, 6) para activar TBK1/IKKepsilon e IKKalpha/IKKbeta. Estas cinasas activan IRF7 y NF-kB respectivamente (54).

La detección de los patrones moleculares asociados a patógenos por los receptores de reconocimiento de patrones eventualmente culmina en la activación de IRF7, NF-kB y AP-1 los cuales se unen a PRD I/III (Dominio de Regulación positiva I/III), PRD II y PRD IV, respectivamente, e inducen la transcripción de los interferones de tipo I y de citocinas proinflamatorias (TNF, IL-6, IL-1 β , etc.) (55). Este interferón de tipo I conduce a la activación transcripcional de varios ISG (genes estimulados por interferón) para montar un estado antiviral en la célula.

1.5.2 Señalización del interferón de tipo I

Los miembros de la familia de interferones de tipo I tienen actividad antiviral al unirse a un receptor común que consiste de 2 subunidades (IFNAR1 e IFNAR2), los cuales se localizan en la superficie de la membrana de la mayoría de células (56).

Los interferones de tipo I pueden formar un complejo ternario con IFNAR 1 e IFNAR 2. Después de la formación de este complejo, comienza la señalización a través de la vía JAK-STAT, para inducir la transcripción de los ISG que son los efectores primarios en la respuesta celular del interferón, para obtener funciones antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras (56,57).

Se han identificado un gran número de ISG. Se clasifican en varias categorías de acuerdo con las funciones biológicas de sus productos, incluidas proteínas antivirales como la cinasa activada por RNA de doble cadena (PKR), la proteína de resistencia a Myxovirus (Mx), la 2',5' oligoadenilato sintetasa (2',5'-OAS), receptores de interferón (IFNAR1 e IFNAR2), citocinas inflamatorias (IL-6 e IL8), factores de señalización transduccionales y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (58). Adicionalmente, los interferones de tipo I producen un efecto de retroalimentación positiva para la producción de interferón de manera autócrina (59).

En resumen, los efectos celulares de los interferones de tipo I son mediados por los ISGs junto con los propios interferones.

1.5.3 Genes estimulados por el interferón alfa de pollo

El interferón alfa de pollo, estimula genes como el de la 2',5'- OAS y la PKR que codifican proteínas antivirales, y ambos son activados por el RNA de doble cadena. El primero induce la degradación del mRNA viral y el segundo interrumpe la traducción de proteínas (60,61).

IFNAR1 e IFNAR2 son elementos esenciales en la vía de señalización de los interferones de tipo I, transducen señales extracelulares del interferón a moléculas intracelulares (62), se ha demostrado que el interferón alfa de pollo estimula la transcripción de IFNAR1, pero no de IFNAR2 (63).

Otros ISG estimulados por el interferón alfa de pollo son la IL-6, involucrada en la defensa del huésped y en la modulación inmune; y el MHC I, que está involucrado en la presentación de antígenos endógenos (63). Otra de las moléculas estimuladas es la STAT1, un componente crítico en la vía de señalización del

interferón de tipo I, éste transmite señales citoplásmicas al núcleo y activa la expresión génica a través de los elementos de respuesta estimulados por interferón (ISREs) (64); por otro lado la proteína de transmembrana inducida por interferón 3 (IFITM3), inhibe la infección viral al bloquear la entrada citoplasmática del virus (65); finalmente el viperín inhibe el tráfico de proteínas solubles virales en los compartimentos citoplasmáticos (66).

La inducción del interferón de tipo I y los genes que estimula se muestran en la figura 1.

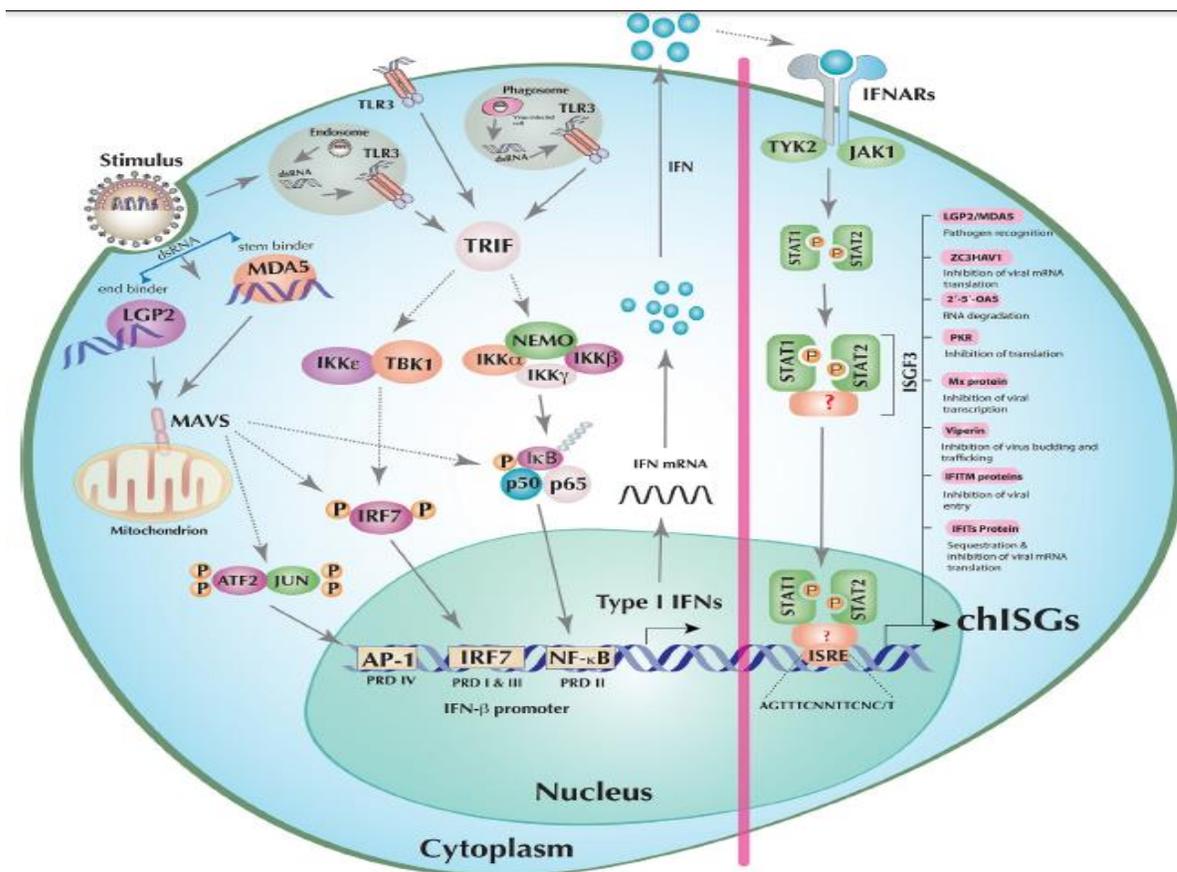


Fig.1 Inducción del interferón y establecimiento de un estado antiviral en una célula de pollo. Tomada de Santakumar et al. 2017.

1.5.4 Interferón recombinante de uso comercial en Medicina Veterinaria

Actualmente, el único interferón disponible con fines terapéuticos de uso comercial es el interferón- ω , administrado en forma de proteína recombinante, que es purificada del fluido corporal de gusanos de seda que han sido infectados con un baculovirus recombinante, que produce el interferón felino (67). Su uso en gatos infectados con virus de la leucemia felina y virus de la inmunodeficiencia felina, en diversos estudios mostró mejoría en los parámetros del hemograma y de la condición clínica de los pacientes (68). Un kit de ELISA utilizado para la determinación cuantitativa del interferón gamma bovino en el plasma, suero y sobrenadante de cultivo bovino, emplea interferón gamma recombinante de bovino como estándar para la cuantificación de la citocina en las muestras (69).

Se ha demostrado la disminución de la carga viral y de los signos respiratorios en aves infectadas con virus de la bronquitis infecciosa debido al uso de interferón alfa de pollo (70). En pollos tratados con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium que expresa el interferón alfa de pollo se ha demostrado una disminución de la mortalidad y el alivio de signos clínicos como tos, sinusitis, diarrea, depresión, reducción en la ingesta de agua y comida, todos ellos causados por el virus de influenza aviar H9N2. En los cuales se obtuvo un 80% de supervivencia en pollitos cuando se inmunizaron previamente con el interferón expresado por *Salmonella*, presentando ligera depresión y anorexia, comparado con el control sin interferón en el que sólo sobrevivieron 40% de los pollitos y presentaron signos más severos (71). Se ha utilizado el Interferón alfa como proteína recombinante administrada por vía oral para inhibir la replicación del virus de influenza aviar H9N2 (72).

Estos resultados han demostrado que el uso del interferón es una alternativa para la terapia contra las enfermedades virales. Sin embargo, se busca disminuir el costo de producción y mejorar su vía de administración, por lo que el uso del IFN recombinante como vacuna génica empaquetado con quitosano es una opción.

2. Justificación

Se propone la subclonación y el empaquetamiento del plásmido conteniendo el gen de interferón alfa de pollo, lo que en estudios posteriores podría servir como adyuvante, ya que estimula la respuesta inmune e inhibe la replicación viral, además su actividad no es específica contra cierto tipo de virus, por lo que confiere protección contra un gran número de éstos.

La tecnología recombinante ofrece la ventaja de generar biológicos de una manera más eficiente y segura. El utilizar un sistema recombinante que requiera un plásmido de expresión para células eucariontes tiene las ventajas de que la proteína obtenida tendrá las modificaciones postraduccionales propias de un organismo eucarionte, también tendrá un plegamiento correcto y estará libre de endotoxinas. Además este sistema puede ser administrado directamente al animal que se desee tratar. Para esto, los productos biológicos provenientes de este tipo de tecnología necesitan un vehículo que pueda introducirlo a las células, que sea seguro para el organismo y que le provea de estabilidad al producto biológico ante el medio. Por esto se propone la utilización del quitosano como un vector seguro, ya que presenta las características deseables para que el producto ingrese en la célula, no sea degradado por nucleasas y ser eliminado de una manera segura por el organismo.

3. Hipótesis

Si la secuencia optimizada del gen de interferón alfa aviar flanqueada por los sitios de restricción Apal y NotI puede ser clonada en un vector de expresión de células eucariontes y si se encapsula con quitosano entonces estará protegida de la acción de ADNasas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

- Clonar la secuencia optimizada del gen de interferón alfa de pollo en un vector de expresión para células eucariontes y empaquetarla con quitosano.

4.2 Objetivos Particulares

- Clonar el gen de interferón alfa aviar en el vector de expresión para células eucariontes pcDNA 3.1 Myc/His A.
- Empaquetar la construcción de pcDNA 3.1 Myc/His A - gen de interferón alfa aviar con quitosano

5. Material y Métodos

5.1 Análisis de la secuencia

La secuencia del gen de interferón alfa aviar se obtuvo de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), con número de acceso U07868.1.

Ésta fue revisada para determinar la presencia de codones raros y los sitios de restricción Apal y NotI que fueron utilizados en este trabajo.

5.2 Optimización de la secuencia, construcción y clonación del gen.

La optimización de la secuencia se realizó con el programa Codon Optimizer, de uso libre (The Biodesign Institute, Universidad de Arizona, USA). Los codones raros fueron sustituidos con el uso de un Índice de Adaptación de Codones (CAI, por sus siglas en inglés) con valor mayor a 0.3 para células eucariotas (73).

De igual manera se agregó una secuencia Kozak (5´ ACCATGG 3´) para facilitar el reconocimiento del codón de inicio en la traducción (AUG). Para su clonación en el plásmido se agregaron los sitios de restricción de las enzimas NotI (5´ GC[^]GGCCGC 3´) en el extremo 5´ y Apal (5´ GGGCC[^]C 3´) en el extremo 3´.

El gen con estas características se sintetizó y se clonó en el plásmido pCR 2.1 TOPO™, para esto se utilizaron los sitios de restricción Apal y NotI. A esta nueva construcción se le llamó pCR IFNChika y fue realizada en el laboratorio de vacunología y constatación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por el equipo de trabajo del Doctor José Alberto Cano Buendía.

5.3 Transformación de pCR IFNChika en *E. coli* TG1 químicamente competentes

La preparación de las *E. coli* TG1 (proporcionadas por el laboratorio de Vacunología y Constatación de la FMVZ, UNAM) y su transformación por el método químico descrito por Sambrook *et al.*(74) se realizó de la siguiente manera:

Preparación de las células procariotas

1. Se tomó una colonia y se transfirió a un matraz de 500 ml con 100 ml de medio Luria Bertani (LB). Se incubó el cultivo por 3 horas a 37 °C con 250 rpm y se monitoreó el crecimiento del cultivo, hasta que alcanzó una OD₆₀₀ de 0.4.
2. Se transfirieron las células bacterianas a tubos de polipropileno de 50 ml estériles. Se enfriaron los cultivos al colocar los tubos en hielo por 10 minutos.
3. Se centrifugó a 2700 g por 10 minutos a 4°C para recuperar las células.
4. Se Decantó el sobrenadante. Se colocaron los tubos en posición invertida sobre papel absorbente por 1 minuto para drenar las últimas trazas de medio.
5. Se resuspendió cada pellet por agitación o en el vortex en 30 ml de una solución fría de MgCl₂-CaCl₂ (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂).
6. Se centrifugó a 2700 g por 10 minutos a 4°C para recuperar las células.
7. Se decantó el sobrenadante. Se Colocaron los tubos en posición invertida sobre papel absorbente por 1 minuto para permitir que las últimas trazas de medio se drenaran.
8. Se resuspendió cada pellet por agitación o en el vortex en 2 ml de solución fría de CaCl₂ 0.1 M por cada 50 ml del cultivo original.
9. En este punto, se usaron las células para la transformación o se repartieron en alícuotas y se congelaron a -70°C.

Transformación

10. Se Utilizaron 200 µl de cada suspensión de células químicamente competentes en un tubo de 1.5 ml estéril y frío. Se agregó el plásmido pCR IFNChika en cada tubo. Se mezcló el contenido del tubo por medio de un pipeteo suave. Se almacenaron los tubos en hielo por 30 minutos.

11. Se transfirieron los tubos a una gradilla colocada en baño de agua recirculante precalentado a 42°C. Se almacenaron los tubos en la gradilla por 90 segundos.
12. Rápida mente se transfirieron los tubos a un baño de hielo y se dejaron enfriar las células por 1-2 minutos.
13. Se agregó 800 µl de medio SOC a cada tubo y se incubó a 37 °C, con 250 revoluciones por minuto, durante 1 hora.
14. Se transfirió 250 µl del cultivo de células competentes transformadas a una placa de medio LB con ampicilina.
15. Se almacenaron las placas a temperatura ambiente hasta que el líquido fue absorbido.
16. Se Invertieron las placas y se incubaron a 37 °C por 15 horas.

5.4 Propagación y purificación del plásmido pCR IFNChika

Para la propagación y purificación del plásmido que contenía el gen de interés se utilizó un kit de extracción de ADN (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems, Promega #A1330)

1. Se sembró una colonia de *E. coli* TG1 transformada con el plásmido pCR IFNChika en 10 ml de medio LB con ampicilina
2. Se Incubó a 37 °C, con 250 rpm durante 16 horas.
3. A las 16 horas se centrifugó 5 minutos a 9 449 rpm para obtener el pellet. Se desechó el sobrenadante y se secó el tubo invertido en papel absorbente.
4. Se agregó 250 µl de la solución de resuspensión celular y se resuspendió el pellet completamente mediante pipeteo.
5. Se agregó 250 µl de la solución de lisis celular y se mezcló al invertir el tubo 4 veces. Se incubó hasta que la suspensión celular se aclaró (aproximadamente de 4 a 5 minutos).
6. Se agregó 10 µl de la solución de proteasa alcalina, se mezcló al invertir el tubo 4 veces y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

7. Se añadió 350 µl de la solución de neutralización e inmediatamente se mezcló al invertir el tubo 4 veces.
8. Se centrifugó el lisado bacteriano a máxima velocidad (alrededor de 21 000 rpm) en una microcentrífuga por 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Se transfirió con una pipeta el lisado claro (aproximadamente 850 µl) a la "columna spin" preparada, en la que se evitó transferir el precipitado blanco.
10. Se centrifugó el sobrenadante a máxima velocidad en una microcentrífuga por 1 minuto a temperatura ambiente. Se removió la "columna spin" del tubo y se decantó el sobrenadante del tubo colector. Se reinsertó la columna en el tubo.
11. Se agregó 750 µl de la solución de lavado de columna.
12. Se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga por 1 minuto a temperatura ambiente. Se removió la "columna spin" del tubo y se decantó el sobrenadante del tubo colector. Se reinsertó la columna en el tubo.
13. Se agregó 250 µl de la solución de lavado.
14. Se centrifugó a máxima velocidad en una microcentrífuga por 2 minutos a temperatura ambiente.
15. Se transfirió la columna a un tubo de 1.5 ml nuevo y estéril.
16. Se añadió 100 µl de agua libre de nucleasas para eluir el ADN plasmídico, y se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente.
17. Después de eluir el ADN se desechó la columna y el tubo, se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.5 Digestión de pCR IFNChika con NotI y Apal

Para liberar el gen de interés, se digirió el plásmido pCR IFNChika con la enzima de restricción NotI (NotI-HF NEB # R3189) conforme a las instrucciones del fabricante (cuadro 1).

Cuadro 1. Cantidades y constantes de reacción para la digestión con NotI.

NotI	10 Unidades
ADN plasmídico	1 µg
10X NEBuffer	2 µl
Volumen total de reacción	20 µl
Tiempo de incubación	30 minutos
Temperatura de incubación	37°C

Posteriormente se digirió con la enzima de restricción Apal (Apal-HF NEB #R0114S) como lo indicaron las instrucciones del fabricante (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cantidades y constantes de reacción para la digestión con Apal.

Apal	10 Unidades
ADN plasmídico	1 µg
10X NEBuffer	2 µl
Volumen total de reacción	20 µl
Tiempo de incubación	30 minutos
Temperatura de incubación	26°C

5.6 Electroforesis en gel de agarosa y purificación de las bandas

Se realizó una electroforesis para visualizar los fragmentos digeridos. Ésta se realizó en gel de agarosa al 1% y se utilizó un amortiguador tris borato-EDTA (TBE), durante 1 hora con 80 V. Se hizo la tinción del gel con bromuro de etidio al 0.05% (#1558-011, Invitrogen) y se observó en un fotodocumentador. Como marcador de tamaño molecular se utilizó el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (#10787018, Invitrogen).

Se cortaron del gel de agarosa las bandas correspondientes al gen de interferón alfa aviar y se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (#A9281, Promega) de la siguiente manera:

1. Se colocaron las bandas cortadas del gel de agarosa en un tubo de 1.5 ml y se agregó 10 µl de solución de unión a la membrana por cada 10 mg de gel cortado. Se agitó en el vortex y se incubó a 50-65°C hasta que el gel se disolvió completamente.
2. Se insertó la minicolumna en el tubo colector.
3. Se transfirió el gel disuelto a la minicolumna y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Se centrifugó a 16000 x g por 1 minuto, se desechó el remanente y se reinsertó la minicolumna en el tubo colector.
5. Se agregó 700 µl de la solución de lavado de membrana y se centrifugó a 16000 x g por 1 minuto. Se desechó el remanente y se reinsertó la minicolumna en el tubo colector.
6. Se agregó 500 µl de la solución de lavado de membrana y se centrifugó a 16000 x g por 5 minutos.
7. Se vació el tubo colector y se volvió a centrifugar la minicolumna armada por 1 minuto con la tapa de la microcentrífuga abierta para permitir la evaporación del etanol residual.
8. Se transfirió la minicolumna a un tubo de 1.5 ml, se agregó 50 µl de agua libre de nucleasas a la minicolumna, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 16000 x g por 1 minuto.
9. Se desechó la minicolumna y se almacenó el ADN a -20°C.

5.7 Reacción de ligazón en vector de expresión de células eucariotas

Para la subclonación del gen de interferón alfa se utilizó el vector pcDNA 3.1/myc-His A (#V80020, ThermoFisher), el cuál posee en su genoma el promotor del Citomegalovirus, el epítipo myc, una cola de histidinas y un gen de resistencia a la ampicilina.

Se realizó la digestión del vector con las enzimas de restricción NotI y Apal y se emplearon las mismas condiciones de reacción que las utilizadas para digerir el vector pCR IFNChika.

Para la subclonación se calculó la relación inserto:vector de 3:1, lo que supuso 32 ng del gen de interferón alfa aviar por cada 100 ng del vector pcDNA 3.1/myc-His A. Se realizó la reacción de ligazón con la T4 DNA Ligasa (#M0202, NEB) de la siguiente manera:

Cuadro 3. Cantidades y constantes de reacción para la ligazón con T4 DNA Ligasa

Buffer T4 DNA Ligasa (10 X)	2 μ l
Vector	100 ng
Inserto	32 ng
Agua libre de nucleasas	A 20 μ l
T4 DNA Ligasa	1 μ l
Tiempo de incubación	10 minutos
Temperatura de incubación	Temperatura ambiente

Posteriormente se tomaron 10 μ l de la reacción de ligazón y se transformó por el método químico en *E. coli* TG1, se sembraron las bacterias transformadas en Agar Luria Bertani con ampicilina.

Se propagaron las colonias que crecieron en el medio selectivo y se purificaron con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega como se explicó anteriormente.

5.8 Análisis de secuencia de la construcción

La Construcción de pcDNA 3.1/myc-His + gen de interferón alfa aviar se secuenció en el instituto de biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la que se utilizó el promotor T7 como iniciador.

5.9 Empaquetamiento con Quitosano

Una vez secuenciada y confirmada la construcción se realizó un Maxiprep y se empaquetó con quitosano (#448869-50G, Sigma-Aldrich) de la siguiente manera:

1. Se prepararon alícuotas del plásmido de 20 µg/ml de la construcción en Na₂SO₄ al 20%, se almacenó el tubo con el plásmido purificado a -20°C hasta su uso.
2. Se pesó el quitosano de bajo peso molecular (50-190 KDa), con el que se preparó una solución al 0.008% (80 µg/ml) con un volumen final de 1 ml de ácido acético al 2%.
3. Se mezcló 500 µl del plásmido con Na₂SO₄ y 500 µl del quitosano con ácido acético en frascos de 5 ml con balas magnéticas y se agitó durante 1 hora en un agitador magnético.
4. Al final se recuperó la mezcla y se centrifugó a 2000 rpm durante 14 minutos.
5. Se separó el sobrenadante y se resuspendió en 20 µl de agua estéril.

Para calcular la eficiencia de encapsulamiento se determinó la cantidad de DNA en el sobrenadante mediante espectrofotometría, en la cual se mide la variación de la absorbancia con la longitud de onda, en la que se utilizó sólo una gota de la muestra. Al término de la medición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%R = [(pADN_{total} - pADN_{libre}) / pADN_{total}] \times 100$$

Donde:

%R= Porcentaje de retención

pADN_{total}= Cantidad total de ADN plasmídico

pADN_{libre}= Cantidad de ADN plasmídico sin encapsular (en el sobrenadante)

5.10 Digestión con quitosanasa y protección contra DNAsas

Se realizó un ensayo con quitosanasa para liberar el plásmido del quitosano de la siguiente manera:

- 15 µl de nanopartículas (Aproximadamente 3 µg de ADN) y 18 µl (0.16 U) de quitosanasa se incubaron a 37°C durante 2 horas.

Después se llevó a cabo la reacción de la DNAsa con 1 µg de plásmido empaquetado y 1 µg de plásmido sin empaquetar de la siguiente manera:

Cuadro 4. Cantidades de reacción para la digestión con DNAsa

Plásmido empaquetado y sin empaquetar	1 µg
DNAsa	2.5 µl (0.078 U)
Buffer 10 X	1.5 µl
Agua libre de endonucleasas	A 15 µl

La reacción se incubó por 5 minutos a 28 °C y se detuvo con 1 µl de EDTA 50 mM a 65°C por 10 minutos.

Los productos de estas reacciones se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6. Resultados

6.1 Análisis de las secuencias

En el genoma del pollo hay al menos 10 genes sin intrones que forman un clúster y que están localizados en el brazo corto del cromosoma Z. Tres de estos genes han sido secuenciados. Su producto es una proteína de 193 aminoácidos (con 31 aminoácidos de secuencia señal), con cuatro sitios potenciales de N-glicosilación y un peso estimado de 19 kDa la cual ha sido determinada interferón de tipo I; ésta tiene 24% de identidad con el IFN- α de mamífero, 20% con el IFN- β de mamífero y sólo un 3% con el IFN- γ de mamífero (75).

El gen de interferón alfa aviar con número de acceso del genbank U07868.1 está compuesto de 767 pb, contiene el péptido señal del sitio 55-147 y la proteína madura del 148-633 (figura 2).



Fig. 2. Secuencia original del gen de interferón alfa aviar; tomado del GenBank con número de acceso U07868.1.

Secuencia Optimizada

Se optimizó la secuencia del interferón alfa de pollo original, en la que se cambiaron los codones raros por codones con un índice mayor de 0.3 para células eucariotas, además se agregó una secuencia Kozak y los sitios de restricción Apal y NotI (Figura 3).



Fig. 3. Secuencia optimizada del gen de interferón alfa aviar, con los sitios de restricción NotI y ApaI a los flancos. (SnapGene).

6.2 Clonación en el vector pCRII-TOPO

El gen optimizado se clonó en el vector pCRII-TOPO, en el que se utilizaron los sitios de restricción NotI y ApaI y se obtuvo una construcción de 4540 pb (figura 4)

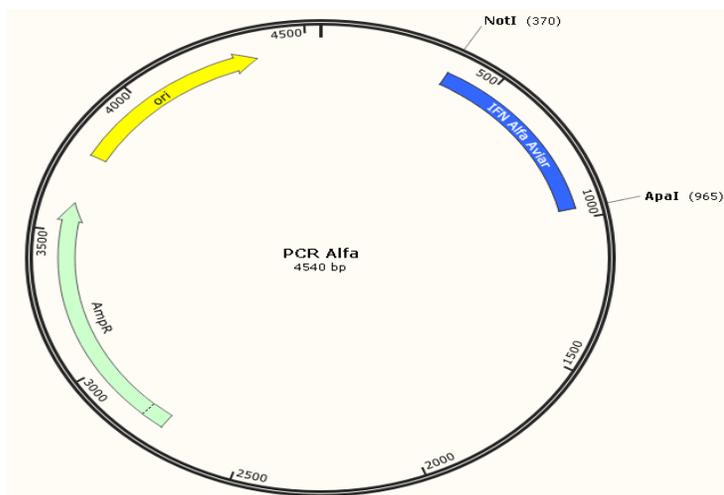


Fig. 4. Mapa del vector pCR con el gen de interferón alfa aviar optimizado (SnapGene).

6.3 Doble digestión de pCR IFNChika y subclonación en el vector de expresión para células eucariontes pcDNA3.1 myc/His A

La construcción pCR IFNChika al igual que el vector de expresión pcDNA3.1 myc/His A se digirieron con las enzimas de restricción Not I y Apa I y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% de ambas digestiones (figuras 5a y b y 6a y b).

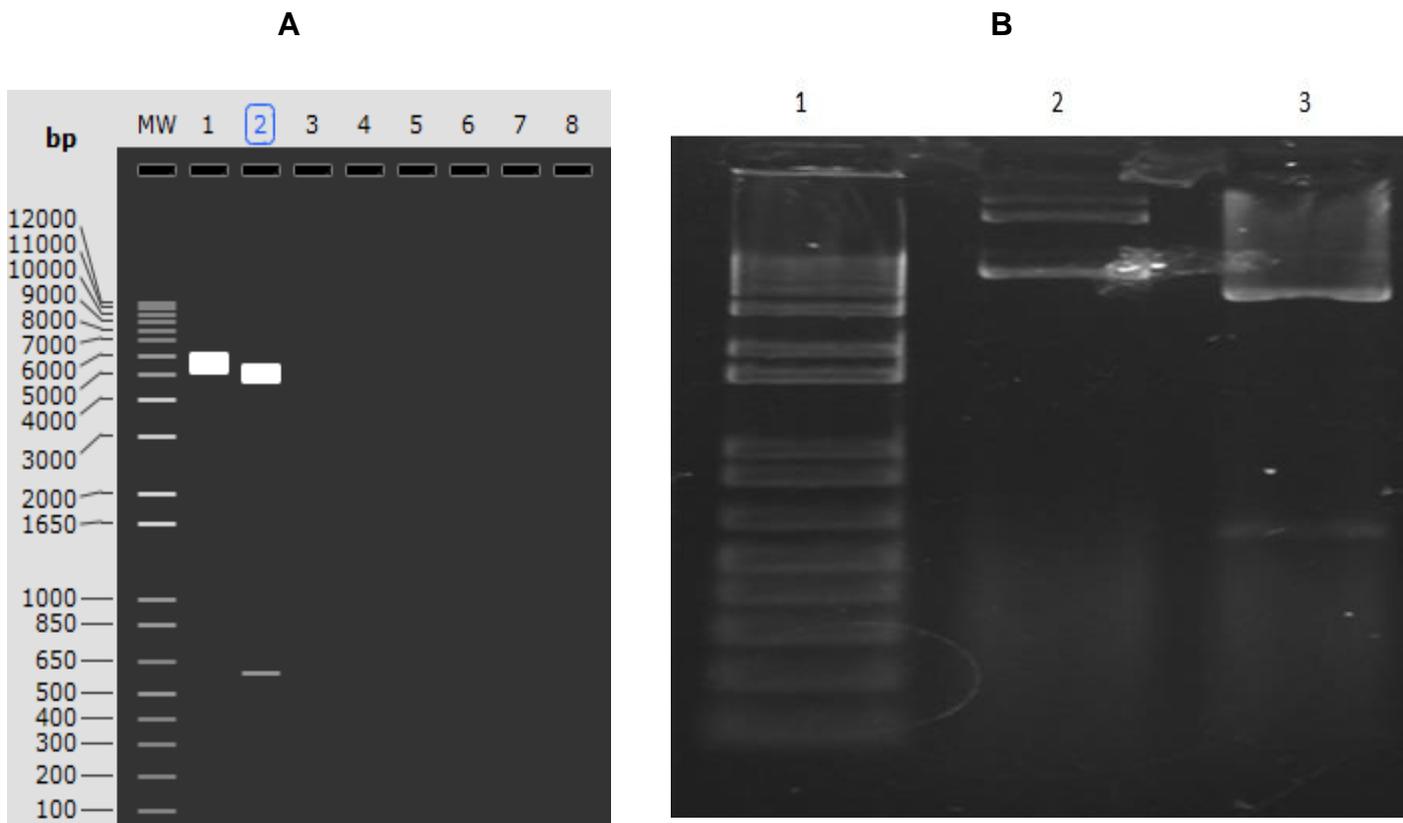


Fig.5. A) Ensayo *in silico* de la digestión con Apa I y Not I de pCR IFNChika (Snap Gene). Carril MW: 1 Kb Plus DNA Ladder; Carril 1: pCR IFNChika sin digerir; Carril 2: pCR IFNChika digerido con Apa I y Not I. B) Electroforesis en gel de agarosa de la doble digestión de pCR IFNChika. Carril 1: 1 Kb Plus DNA Ladder; Carril 2: pCR IFNChika sin digerir Carril 3: pCR IFNChika digerido con NotI y Apal.

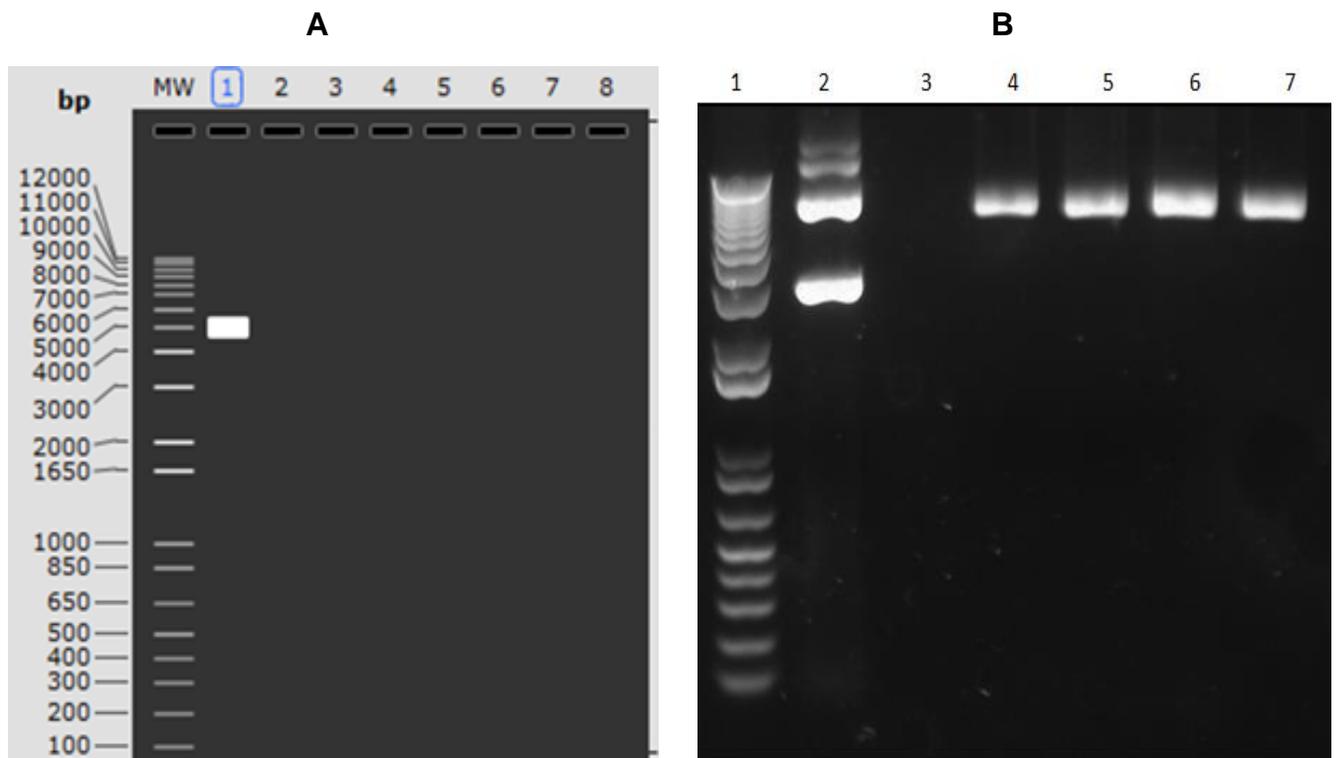


Fig. 6. A) Ensayo *in silico* de la doble digestión de pcDNA3.1 myc/His A. Carril MW: 1Kb Plus DNA Ladder; Carril 1: doble digestión con Apal y NotI de pcDNA3.1 myc/His A. B) Electroforesis en gel de agarosa de la doble digestión de pcDNA 3.1 myc/His A. Carril 1: 1 Kb Plus DNA Ladder; Carril 2: pcDNA sin digerir; Carril 3: vacío; del Carril 4 al 8: pcDNA digerido con NotI y Apal.

Al término de la electroforesis tanto la banda correspondiente al pcDNA 3.1 myc/His A digerido como la banda del fragmento liberado del vector PCR alfa, que contiene el gen de interés fueron cortadas y purificadas del gel de agarosa.

Las bandas purificadas se utilizaron para la reacción de Ligazón, en la que se obtuvo una nueva construcción que se denominó pcDNA Alfa (figura 8).

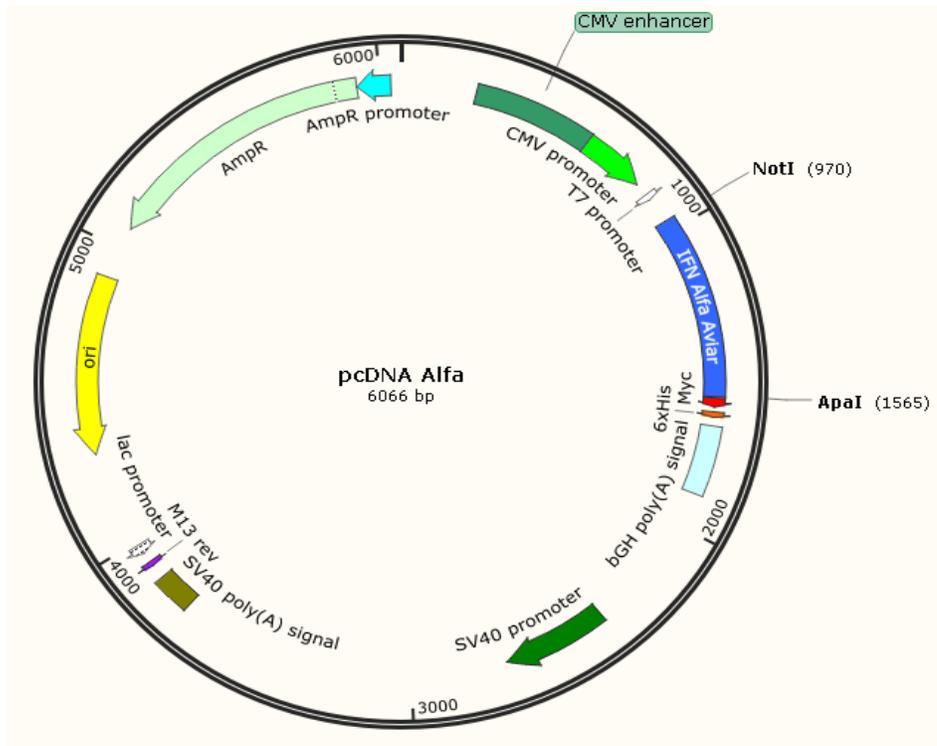


Fig.7. Mapa de la construcción pcDNA Alfa.

La construcción se transformó en *E. coli* TG1 al igual que los controles pcDNA 3.1 myc/His A digerido con NotI y ApaI y un plásmido íntegro con la resistencia a ampicilina, posteriormente se sembraron en medio LB con ampicilina junto con un control de células (Figura 9).

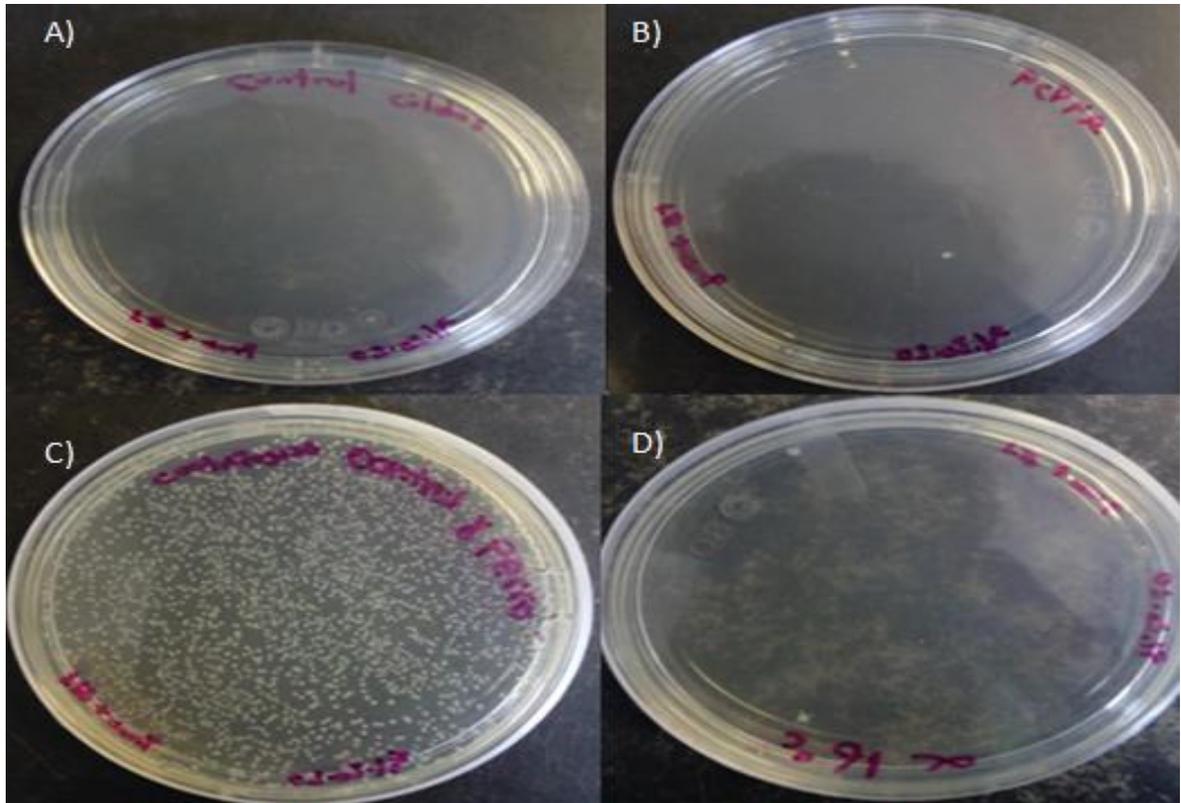


Fig.8. Transformación de *E.coli* TG1. A) *E. coli* TG1 sin transformar; B) *E. coli* TG1 transformada con el vector pcDNA 3.1 myc/His A digerido con Apal y NotI; C) *E. coli* TG1 transformada con un vector completo; D) *E. coli* TG1 transformada con la ligazón de pcDNA 3.1 myc/His A con el gen de interferón alfa aviar.

6.4 Secuenciación

Las dos colonias se tomaron para hacer extracción de DNA y se secuenciaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, donde se usaron los iniciadores T7 forward y M13 reverse.

6.5 Empaquetamiento con quitosano, digestión con quitosanasas y protección contra DNAsa

Una vez confirmada la secuencia de la construcción se procedió a empaquetarla con quitosano y a realizar un ensayo para liberarlas con la enzima quitosanasas y para evaluar la protección del quitosano contra la enzima DNAsa (Figura 10).

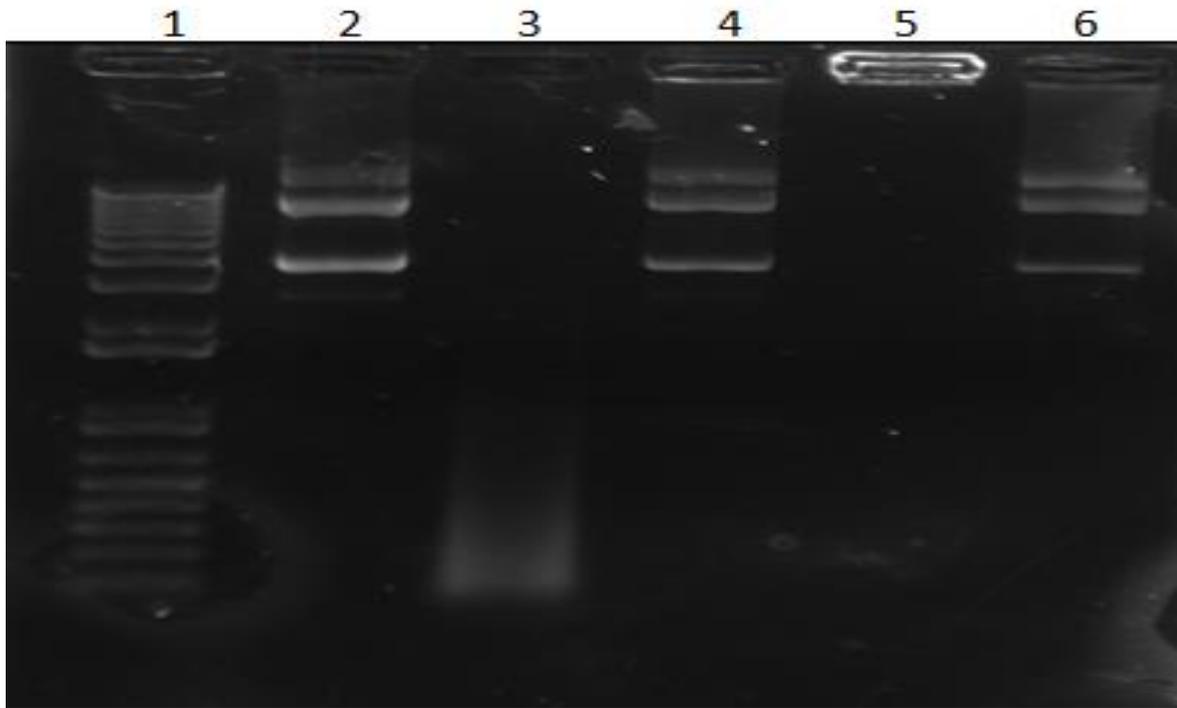


Fig. 9. Liberación del ADN con quitosanasa y protección contra DNAsa. Electroforesis en gel de agarosa al 1%: Carril 1: 1 Kb plus DNA Ladder; carril 2: Plásmido desnudo; Carril 3: Plásmido Desnudo con 0.078 U de DNAsa; Carril 4: Plásmido desnudo con 0.16 U de quitosanasa; Carril 5: Nanopartículas (ADN más quitosano); Carril 6: Nanopartículas con 0.078 U de DNAsa y 0.16 U de quitosanasa.

7. Discusión

La expresión del interferón alfa del pollo recombinante se ha logrado en diversos sistemas como en la lechuga (*Lactuca sativa* L.) (76), en la levadura *Pichia pastoris* (77) y en *Escherichia coli* cepa BL21 (78). Mientras que el nivel de expresión del interferón obtenido en la lechuga fue de 0.393 µg de proteína por kg de tejido, lo que se consideró insuficiente, el obtenido en la levadura tuvo un buen rendimiento de 128 mg por Litro de cultivo, pero presentó mutaciones en algunos codones, lo que resultó en la modificación de la secuencia de aminoácidos, además de que la proteína tuvo un mayor peso molecular, lo que fue atribuido a un aumento en el grado de glicosilación por la levadura. Por último el interferón tuvo el tamaño predicho de la proteína de 19 KDa y aunque no se menciona la cantidad obtenida, se ha observado en otros estudios que las proteínas obtenidas en *E. coli* arrojan buenos rendimientos de aproximadamente 200 mg de proteína por Litro de cultivo (79). A pesar de estas ligeras diferencias todos presentaron disminución de la actividad viral contra virus de la estomatitis vesicular en fibroblastos de embrión de pollo, contra virus de la estomatitis vesicular y virus de Newcastle en fibroblastos de embrión de pollo, y contra virus de la leucosis aviar en células DF-1 cuando se utilizaron los interferones producidos en *Lactuca sativa* L., *Pichia pastoris* y *Escherichia coli* BL21, respectivamente. Por lo que se espera que la expresión del interferón alfa de pollo en células animales tenga la misma actividad antiviral reportada en estos estudios, además de que tenga el tamaño y la secuencia de aminoácidos correcta.

Una manera de mejorar la expresión de la proteína es mediante la optimización de los codones del gen, esto se logra cambiando los codones que tienen menor frecuencia de uso para un organismo dado. Lee et al. mejoraron el rendimiento de la proteína VP1 del virus de la anemia del pollo al cambiar los codones raros de esta proteína por los usados con mayor frecuencia en *Escherichia coli*, logrando un rendimiento de 4.1 veces superior del alcanzado con el gen sin optimizar (80). Inouye et al. obtuvieron un rendimiento de 2.3 veces más grande utilizando el gen optimizado de la Luciferasa en comparación con el gen nativo (81).

El quitosano es un vector no viral adecuado para la transfección debido a que posee propiedades deseadas como estabilidad en almacenamiento, facilidad de producir en grandes cantidades y la capacidad de ser administrado repetidamente con una mínima respuesta inmune del huésped (82). Además es considerablemente más económico administrar el ADN empaquetado con quitosano que utilizar otro tipo de vector no viral como la lipofectamina 3000 (#L3000001, Thermo Fisher), la cual ha sido ampliamente utilizada en diversos estudios debido a su alto porcentaje de transfección, y, de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante necesita 2 μl de este reactivo para administrar 1 μg de ADN, lo que costaría \$33.34 pesos. Por otro lado la polietilenimina (PEI) es un polímero sintético considerado como el estándar de oro para la transferencia de genes tanto *in vitro* como *in vivo* (83). Boussif et al. (84) utilizaron 0.5 μl de PEI (#P3143, Merck) por μg de ADN, lo que equivale a un costo de \$0.0054 pesos. Mientras que con el protocolo utilizado en este trabajo para empaquetar con quitosano de bajo peso molecular (#448869-50G, Sigma-Aldrich) se necesitan 4 μg para 1 μg de ADN, lo que cuesta \$0.000023 pesos, sin considerar el precio de los diluyentes de cada uno. Por lo que el quitosano es la opción más barata debido a que su síntesis no es costosa porque se obtiene de la quitina que es un producto de desecho.

La relación utilizada en este trabajo para empaquetar fue de 4 veces la cantidad de quitosano de 90-150 KDa con respecto al ADN debido a que se obtiene una buena eficiencia de encapsulamiento y a que se forman nanopartículas estables y uniformes cuando se utilizan relaciones desde 1.25:1 hasta 10:1 (82), por lo que se utilizó un valor intermedio de 4:1 que no fuera tan susceptible a las variaciones en este protocolo, como el peso molecular del quitosano o las soluciones utilizadas para empaquetar. Además de que el costo no se incrementa significativamente comparado con la relación más pequeña.

La protección que otorga el quitosano al ADN es consistente con los resultados de Mao et al., Bivas-Benita et al. y Khatri et al. donde se han utilizado desde 0.1 hasta

1 µg de DNAsa, en los que se observó el ADN íntegro en el gel de agarosa (82,85,86).

Se ha reportado que relaciones de quitosano:ADN desde 1:1 hasta 10:1 generan eficiencia de transfección similar o ligeramente superior a las que se logran cuando se utiliza el plásmido desnudo combinado con lípidos catiónicos (82,87). Malakooty et al. obtuvieron una mejor eficiencia de transfección al utilizar el quitosano de menor peso molecular de los probados en su estudio (88). Por lo que se espera que la relación quitosano:ADN y el peso molecular del quitosano utilizado en este estudio obtenga resultados similares al ocupar una línea celular adecuada, ya que se ha visto que hay líneas celulares como HEK293 o IB-3-1 que tienen una mejor eficiencia de transfección que otras como HeLa (82).

El mejoramiento de la respuesta inmune utilizando citocinas se ha demostrado previamente por Zhang et al., quienes demostraron que la IL-2 de pollo aumenta la expresión de IFN-γ, además administraron una vacuna de Newcastle junto con un plásmido conteniendo la IL-2 de pollo previo al desafío, observando que un 70% de pollos sobrevivieron en comparación del 40% y 30% de sobrevivientes en los grupos que fueron inoculados únicamente con el plásmido vacío y con quitosano (89).

8. Conclusiones

- Se logró la clonación del gen de interferón alfa aviar en el vector de expresión eucarionte pcDNA 3.1 Myc/His A con la utilización de los sitios de restricción Apal y NotI.
- El ADN fue encapsulado con el quitosano en una relación 4:1 (Quitosa:ADN) y liberado posteriormente con el uso de la enzima quitosanasasa.
- Se observó que el ADN encapsulado puede ser protegido de la acción de ADNasas.

9. Prospectivas

- Estudiar la viabilidad de las nanopartículas a temperatura ambiente y a 4 °C desde 1 semana hasta 1 año.
- Transfectar células eucariontes con la construcción pcDNA-interferón alfa tanto desnuda como empaquetada con quitosano.
- Evaluar cuál es la mejor proporción ADN:Quitosano para transfectar
- Comparar la expresión de la proteína optimizada con la proteína nativa.

Anexo 1. Medios y Reactivos

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 y 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 SOC

20 g Bacto-triptona

5 g Extracto de levadura

2 ml NaCl 5 M

2.5 ml KCl 1 M

10 ml MgCl₂ 1M

10 ml MgSO₄ 1 M

20 ml Glucosa 1 M

para un volumen de 1 L. Esterilizar en autoclave.

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

Referencias

1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [Internet]. 2013 [citado 25 de abril de 2019]. The role of poultry in human nutrition. Disponible en: <http://www.fao.org/3/al709e/al709e00.pdf>
2. Branckaert R, Gaviria L, Jallade J, Seiders R. Transfer of technology in poultry production for developing countries. En: *FAO Sustainable Development Dimensions*, Octubre 2000 [citado 25 de abril de 2019] . Disponible en: www.fao.org/ag/aga/AGAP/LPA/fampo1/links.htm
3. Unión Nacional de Avicultores [Internet]. Situación de la Avicultura Mexicana . 2018 [citado 25 de abril de 2019] Disponible en: <http://www.una.org.mx/index.php/panorama/situacion-de-la-avicultura-mexicana>
4. World Bank [Internet]. Avian and Human Pandemic Influenza - Economics and Social Impacts. 2005 [Citado 25 de abril de 2019] Disponible en: <http://www.worldbank.org/content/dam/Worldbank/document/HDN/Health/AHI-Sociolmpacts.pdf>
5. Farsang A, Ros L, Renstrom C, Baule T. Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathol.* 2002;31:229-36.
6. Fenner F, White D. *Fenner's Veterinary Virology*. 4.^a ed. London, UK. Elsevier; 2011.
7. Palug G. Combined strategies for gene therapy of AIDS. *Gene Ther.* 1997;4:179-80.
8. Schmitz V, Qian C, Ruiz J. Gene Therapy for Liver Diseases: Recent Strategies for Treatment of Viral Hepatitis and Liver Malignancies. *Gut.* 2002;50:130-5.
9. Gaspar P, Oliveira J, Frommlet J, Santos M, Moura G. EuGene: maximizing synthetic gene design for heterologous expression. *Bioinformatics.* 2012;28:2683-4.
10. Crick F, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin R. General nature of the genetic code for proteins. *Nature.* 1961;192:1227-32.
11. Hershberg R, Petrov D. Selection on codon bias. *Annu Rev Genet.* 2008;42:287-99.
12. Plotkin J, Kudla G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet.* 2011;12:32-42.
13. Sharp P, Tuohy T, Mosurski K. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 1986;14:5125-43.
14. Bennetzen J, Hall B. Codon selection in yeast. *J Biol Chem.* 1982;257:3026-31.
15. Ikemura T. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J Mol Biol.* 1981;146:1-21.

16. Sharp P, Li W. The codon adaptation index, a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* 1987;15:1281-95.
17. Raab D, Graf M, Notka F, Schödl T, Wagner R. The GeneOptimizer Algorithm: using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multiparameter DNA sequence optimization. *Syst Synth Biol.* 2010;4:215-25.
18. Onishi H, Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials.* 1999;20:175-82.
19. Romoren k, Thu B, Evensen O. Immersion delivery of plasmid DNA. II. A study of the potentials of a chitosan delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Controlled Release.* 2002;85:215-25.
20. Rao S, Sharma C. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemstatic potential. *J Biomed Mater Res.* 1997;34:21-8.
21. Aspden T, Mason J, Jones N, Lowe J, Skaugrud O. Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solution on in vitro and in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J Pharm Sci.* 1997;86:509-13.
22. Fang N, Chan V, Mao H, Leong K. Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromolecules.* 2001;2:1161-8.
23. Cui Z, Mumper R. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. *J Controlled Release.* 2001;75:409-19.
24. Takeuchi H, Yamamoto H, Niwa T, Hino T, Kawashima Y. Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm Res.* 1996;13:896-901.
25. Borchard G. Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52:142-50.
26. Ishii T, Okahata Y, Sato T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1514:51-64.
27. Roy K, Mao H, Huang S, Leong K. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med.* 1999;5:387-91.
28. Li X, Lee D, Chan A, Alpar H. Sustained expression in mammalian cells with DNA complexed with chitosan nanoparticles. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1630:7-18.
29. Kumar M, Behera A, Hellermann G, Lockey R, Mohapatra S. Chitosan IFN-gamma-pDNA Nanoparticle (CIN) Therapy for Allergic Asthma. *Genet Vaccines Ther.* 2003;1:3-13.
30. Di Pasquale A, Preiss S, Tavares F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines.* 2015;3: 320-43.

31. Marrack P, McKee A, Munks M. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:287-93.
32. Arrazola M, de Juanes J, García I. Conceptos generales. Calendarios de vacunación sistemática del niño y del adulto en España. Impacto de los programas de vacunación. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2015;33:58-65.
33. Coffman R, Sher A, Seder R. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity*. 2010;33:492-503.
34. Thompson A, Staats H. Cytokines: The Future of Intranasal Vaccine Adjuvants. *J Immunol Res*. 2011; 2011: 1-17.
35. Mosmann T, Li L, Hengartner H, Kagi D, Fu W, Sad S. Differentiation and functions of T cell subsets. *Ciba Found Symp*. 1997;204:148-58.
36. Mosmann T, Sad S. The expanding universe of T-cells subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996;17:138-46.
37. Asif M, Jenkins K, Hilton L, Kimpton W, Lowenthal J. Cytokines as adjuvants for avian vaccines. *Immunol Cell Biol*. 2004;82(6):638-43.
38. Schijns V, Weining K, Nuijten P, Rijke E, Staeheli P. Immunoadjuvant activities of *E. coli* and plasmid-expressed recombinant chicken IFN alpha/beta, IFN gamma and IL-1 beta in 1 -day- and 3 week-old-chickens. *Vaccine*. 2000;18:2147-54.
39. Hilton L, Bean A, Kimpton W, Lowenthal J. Interleukin-2 directly induces activation and proliferation of chicken T cells in vivo. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22:755-63.
40. Lowenthal J, O'Neil T, Broadway M. Co-administration of IFN-gamma enhances antibody responses in chickens. *J Interferon Cytokine Res*. 1998;18:617-22.
41. Su B, Chiu H, Lin C, Shien J, Yin H, Lee L. Adjuvant activity of chicken interleukin-12 co-administered with infectious bursal disease virus recombinant VP2 antigen in chickens. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011;139:167-75.
42. Karaca K, Sharma J, Winslow. Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following in ovo or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine*. 1998;16:1496-503.
43. Issacs A, Lindenmann J. Virus Interference. I. The Interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1957;147:258-67.
44. Sick C, Schultz U, Staeheli P. A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *J Biol Chem*. 1996;271:7635-9.
45. Fensterl V, Sen C. Interferons and viral infections. *Biofactors*. 2009;35:14-20.
46. Randall R, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*. 2008;89:1-47.

47. Rathinam V, Fitzgerald K. Innate Immune sensing of DNA viruses. *Virology*. 2011;411:153-62.
48. Baron S, Dianzani F. The interferons: a biological system with therapeutic potential in viral infections. *Antivir Res*. 1994;24:97-110.
49. Rasmussen S, Reinert L, Paludan S. Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense. *APMIS*. 2009;117:323-7.
50. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Akira S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303:1526-9.
51. Karpala A, Stewart C, McKay J, Lowenthal J, Bean A. Characterization of chicken Mda5 activity: regulation of IFN beta in the absence of RIG-I functionality. *J Immunol*. 2011;186:5397-405.
52. Roach J, Glusman G, Rowen L, Kaur A. The evolution of vertebrate toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:9577-82.
53. Kindler E, Thiel V, Weber F. Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response. En: *Advances in Virus Research* [Internet]. Elsevier; 2016 [citado 25 de abril de 2019]. p. 219-43. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352716300458>
54. Belgnaoui S, Paz S, Hiscott J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr Opin Immunol*. 23:564-72.
55. Kim T, Zhou H. Functional analysis of chicken IRF7 in response to dsRNA analog poly (I:C) by integrating overexpression and knockdown. *PLoS One*. 2015;10.
56. Cleary C, Donnelly R, Soh J, Mariano T. Knockout and reconstitution of a functional human type I interferon receptor complex. *J Biol Chem*. 1994;269:18747-9.
57. Schoggins J, Wilson S, Panis M, Murphy M, Jones C. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*. 2011;472:481-5.
58. de Veer M, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol*. 2001;69:912-20.
59. Honda K, Takaoka K, Taniguchi T. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*. 2006;25:349-60.
60. Samuel C. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:778-809.
61. Karpala A, Lowenthal J, Bean A. Identifying innate immune pathways of the chicken may lead to new antiviral therapies. *Vet Immunol Immunopathol*. 2012;148:100-9.
62. Platanias C. Mechanisms of type-I and type-II interferon mediated signaling. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:375-86.

63. Hongren Q, Liming Y, Shanshan M, Lei X, Yuhai B, Xiaojuan J. The Differential Antiviral Activities of Chicken Interferon α (ChIFN- α) and ChIFN- β are Related to Distinct Interferon-Stimulated Gene Expression. *PLoSOne*. 2013;8.
64. Schindler C, Levy D, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*. 2007;282:20059-63.
65. Yount J, Moltedo B, Yang Y, Charron G, Lopez C. Palmitoylome profiling reveals S-palmitoylation-dependent antiviral activity of IFITM3. *Nat Chem Biol*. 2010;6:610-4.
66. Tan K, Olfat F, Phoon M, Hsu P. In vivo and In vitro studies on the antiviral activities of viperin against influenza H1N1 virus infection. *J Gen Virol*. 2012;93:429-38.
67. Ueda Y, Sakurai T, Yanai A. Homogeneous production of feline interferon in silkworm by replacing simple amino acid code in signal peptide region in recombinant baculovirus and characterization of the product. *J Vet Med Sci*. 1993;2:251-8.
68. Doménech A, Miró G, Collado V, Ballesteros N, Sanjosé L, Escolar E, et al. Use of recombinant interferon omega in feline retrovirogenesis: from theory to practice. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011;143:301-6.
69. BioRad. Bovine Interfeon Gamma ELISA Kit. Disponible en: <https://www.bio-rad-antibodies.com/interferon-gamma-antibody-range.html>; 2019.
70. Pei J, Sekellick M, Marcus P, Choi I, Collisson E. Chicken Interferon Type I Inhibits Infectious Bronchitis Virus Replication and Associated Respiratory Illness. *J Interferon Cytokine Res*. 2001;21:1071-7.
71. Rahman M, Uyangaa E, Han Y, Kim S, Kim J, Choi J. Oral administration of live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing chicken interferon- α alleviates clinical signs caused by respiratory infection with avian influenza virus H9N2. *Vet Microbiol*. 2011;154:140-51.
72. Meng S, Yang L, Xu C, Qin Z, Xu H, Wan Y. Recombinant Chicken Interferon- α Inhibits H9N2 Avian Influenza Virus Replication In Vivo by Oral Administration. *J Interferon Cytokine Res*. 2011. 7: 533-8
73. Puigbo P, Guzmán E, Romeu A, Garcia-Vallve S. CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biol Direct*. 2008. 3: 1-8.
74. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
75. Giansanti F, Giardi M, Botti D. Avian Cytokines - An Overview. *Curr Pharm Des*. 1 de agosto de 2006;12(24):3083-99.
76. Song L, Zhao D, Wu Y, Li Y. Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce. *J Zhejiang Uni Sci B*. 2008;9:351-5.
77. Hou F, Liu K, Shen T, Zhou B, Cao R, Li P, et al. Antiviral activity of rChIFN-a against vesicular stomatitis virus and Newcastle disease virus: A novel recombinant chicken interferon-a showed high antiviral activity. *Res Vet Sci*. 2011;91:73-9.

78. Dai M, Wu S, Feng M, Feng S, Sun C. Recombinant chicken interferon-alpha inhibits the replication of exogenous avian leukosis virus (ALV) in DF-1 cells. *Mol Immunol*. 2018. 76:62-9.
79. Park T, Kim J, Choi S, Kim Y. Cloning, expression, isotope labeling, purification, and characterization of bovine antimicrobial peptide, lactophorin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2009. 65:23-9.
80. Lee M-S, Hseu Y-C, Lai GH, Chang W te. High yield expression in a recombinant *E. coli* of a codon optimized chicken anemia virus capsid protein VP1 useful for vaccine development. *Microb Cell Factories*. 2011;10(56):1-11.
81. Inouye S, Sahara-Miura Y, Sato J, Suzuki T. Codon optimization of genes for efficient protein expression in mammalian cells by selection of only preferred human codons. *Protein Expr Purif*. 2015;109:47-54.
82. Mao H, Roy K, Troung-Le V, Janes K, Lin K, Wang Y. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficacy. *J Controlled Release*. 2001;70:399-421.
83. Ramamoorth M, Aparna N. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *J Clin Diagn Res*. 2015;9:1-6.
84. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta M, Mergny M. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92:7297-301.
85. Bivas-Benita M, Laloup M, Versteyshe S, Dewit J. Generation of *Toxoplasma gondii* GRA 1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies. *Int J Pharm*. 2003;266(1):17-27.
86. Khatri K, Goyal A, Gupta P, Mishra N. Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B. *Int J Pharm*. 2008;354:235-41.
87. Sun Y, Zhang S, Peng X, Gong Z, Li X. Preparation, characterization and transfection efficacy of chitosan nanoparticles containing the intestinal trefoil factor gene. *Mol Biol Rep*. 2011;39(2):945-52.
88. Malakooty E, Baghaban M, Gheibi N, Atyabi F. Chitosan-pDNA nanoparticle characteristics determine the transfection efficacy of gene delivery to human mesenchymal stem cells. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol*. 2013;42(6):376-84.
89. Zhang W, Yin Z, Liu N, Yang T, Wang J, Bu Z, et al. DNA-Chitosan nanoparticles improve DNA vaccine-elicited immunity against Newcastle disease virus through shuttling chicken interleukin-2 gene. *J Microencapsul*. 2010;27:693-702.