



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN**  
**CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“Evaluación de la actividad antiviral de los interferones  
aviares *alpha* y *gamma* recombinantes  
frente al virus de viruela aviar”**

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

**P R E S E N T A:**  
MVZ. SERGIO DAVID RODRÍGUEZ TOLEDANO

**TUTOR:**  
Dr. JAIME CAMPUZANO GRANADOS (FMVZ, UNAM)

**COMITÉ TUTORAL:**  
Dra. NORMA LETICIA CALDERÓN APODACA (FMVZ, UNAM)  
Dra. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN (Instituto de Investigaciones  
Biomédicas, UNAM)



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.

## **DEDICATORIA**

### **A mi madre Juanita:**

“Crecí viendo a mi madre superar cada obstáculo que la vida le ponía, pasó por momentos muy difíciles, que a veces se iba dormir sintiéndose exhausta y con lagrimas en los ojos, pero aun así se levantaba cada madrugada con energía y ánimo, para dar su mayor esfuerzo y darnos amor incondicional, soy alguien fuerte, porque fui criado por alguien más fuerte que yo.”

### **A mi padre Sergio:**

“Quiero que recuerdes una cosa, tu tormento me formo, a ti te debo mi victoria”. Te extraño.

### **A mis hermanos Tania, Nayeli, Alexis y Elizabeth:**

Por su apoyo constante y motivo de inspiración para seguir superándome.

### **A mis sobrinos Carla, Ariadne y León:**

Ustedes son una parte de mis alegrías y doy gracias a Dios por permitirme estar con ustedes cada día.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por abrirme los caminos, ser mi apoyo en cada caída y empujarme cada vez que sentía retroceder en mi vida.

A la UNAM por permitirme ser parte de ella.

A CONACYT por brindarme apoyo económico en la mayor parte de mis estudios.

Al Dr. Jaime Campuzano Granados, con gran agradecimiento por su paciencia y tiempo que dedico para dirigir este trabajo.

A la Dra. Norma Leticia Calderón Apodaca, por estar siempre al pendiente del trabajo y al mismo tiempo de sus correcciones de este.

A la Dra. Clara Espitia Pinzón, por sus críticas en los tutoriales.

A cada uno de mi Jurado: Dr. Leopoldo Henri Paasch Martínez, Dra. Gabriela Guadalupe Gómez Verduzco, Dr. Guillermo Téllez Islas, por sus revisiones y correcciones, que permitieron mejorar este trabajo.

Al Dr. Rubén Merino, quién me aconsejo en los primeros pasos de esta nueva etapa.

A la Dra. Carranza Vera, por sus consejos personales para seguir y no rendirme a pesar de la pandemia que azoto al mundo.

A los chicos que conocí en Canadá, ya que me ayudaron a entender que debo de mejorar todavía más en mi vida.

A los granjeros de Canadá que me dieron trabajo, puesto que el dinero ganado me ayudó a sostener los gastos de la titulación, ya que por la pandemia perdí la beca.

Y a todas las personas que durante mi camino hasta aquí me enseñaron grandes lecciones, me dieron buenos consejos, me escucharon en su momento y me tendieron la mano cuando la necesitaba.

**"No es el más fuerte de las especies el que sobrevive, tampoco es el más inteligente el que sobrevive. Es aquel que es más adaptable al cambio"**

Charles Darwin

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
I.I. Antecedentes de los Interferones .....	3
I.II. Naturaleza de los IFN´s .....	4
I.III. Inducción de los interferones .....	5
I.III.I. Tipo I.....	5
I.III.II. Tipo II .....	7
I.IV. Receptores de citocinas de clase II .....	8
I.V. Cascada de transducción de señales IFN .....	9
I.VI. Genes estimulados por interferón.....	11
I.VI.I. Proteínas de resistencia al mixovirus (Mx) .....	11
I.VI.II. Proteína quinasa R.....	11
I.VI.III. 2'- 5'-oligoadenilato sintetasa.....	12
I.VIII. Antecedentes .....	13
II. JUSTIFICACIÓN.....	14
III. HIPÓTESIS.....	15
I.V. OBJETIVO GENERAL.....	15
IV.I. Objetivos específicos .....	15
V. MATERIAL Y MÉTODOS .....	16
V.I. Genes de INF <i>alpha</i> y <i>gamma</i> aviar.....	16
V.II. Optimización de las secuencias y construcción de los genes de interferón <i>alpha</i> y <i>gamma</i> aviar.....	16
V.III. Electroforesis.....	17
V.IV. Purificación de bandas del gel de agarosa.....	17
V.V. Clonación en el vector cloneJET .....	17
V.VI. Purificación de DNA plasmídico.....	18
V.VII. Doble digestión .....	18
V.VIII. Digestión y subclonación en el vector de expresión pBAD Myc/His A .....	18
V.IX. Digestión del vector.....	18
V.X. Subclonación.....	18
V.XI. Purificación de DNA plasmídico. ....	19
V.XII. Secuenciación de las construcciones y expresión de las proteínas .....	19

V.XIII. Secuenciación.....	19
V.XIV. Inducción de la expresión .....	20
V.XV. Análisis e identificación de las proteínas .....	21
V.XVI. SDS-PAGE e Inmunotransferencia.....	21
V.XVII. Obtención de las proteínas recombinantes solubles .....	21
V.XVIII. Purificación mediante cromatografía de afinidad.....	22
V.XIX. Cuantificación de Proteínas.....	22
V.XX. Electroforesis bidimensional e Inmunoblot.....	22
VI. RESULTADOS .....	23
VI.I. Análisis de las secuencias .....	23
VI.II. Clonación en el vector pCRII-TOPO.....	24
VI.III. Doble digestión de pCR IFNChikay subclonación en el vector de expresión para células eucariontes pcDNA3.1 myc/His A.....	24
VI.IV. Secuenciación .....	27
VII. DISCUSIÓN .....	28
VIII. CONCLUSIÓN.....	31
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	32

## ÍNDICE DE IMÁGENES

**Imagen 1.** Las familias de interferón y sus receptores afines. Las tres familias distintas de IFN en mamíferos, el tipo I, tipo II y tipo III, se unen a un complejo receptor de citocinas de clase II distinto. Todos los miembros de la familia IFN tipo I se unen a IFNAR1 e IFNAR2. El único miembro de la familia de IFN tipo II, IFN- $\gamma$ , se une a IFNGR1 e IFNGR2. Los IFN de tipo III se unen a la única subunidad IFN $\lambda$ R1 y a la subunidad IL10R2 multifuncional, que pueden asociarse con otras cadenas de citocinas R1 de clase II. .... 8

**Imagen 2.** Vías de señalización activadas por IFN- $\alpha$  /  $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Las actividades biológicas de los IFN se inician uniéndose a sus receptores afines. Esto conduce a la activación de tirosina quinasas asociadas a receptores. Estas quinasas fosforilan a los miembros de la familia STAT de factores de transcripción, que pueden ingresar al núcleo y, ya sea solos o en combinación con p48, se unen a los promotores de genes diana y provocan la activación transcripcional específica del gen..... 10

**Imagen 3.** La vía de señalización de interferón tipo III. Los IFN de tipo III se unen a su receptor IFN $\lambda$ R1 / IL10R2 y señalizan a través de la vía Jak / STAT. La fosforilación ocurre después de la unión de IFN- $\lambda$ , lo que conduce a que las proteínas STAT formen homodímeros o heterodímeros antes de la translocación al núcleo donde se unen a las regiones promotoras de los ISG..... 10

<b>Imagen 4.</b> Secuencia original del gen de interferón <i>alpha</i> aviar; tomado del GenBank con número de acceso U07868.1.....	23
<b>Imagen 5.</b> Secuencia optimizada del gen de interferón <i>alpha</i> aviar, con los sitios de restricción NotI y Apal a los flancos. (SnapGene).....	23
<b>Imagen 6.</b> Mapa del vector pCR con el gen de interferón <i>alpha</i> aviar optimizado (SnapGene) .....	24
<b>Imagen 7.</b> A) Ensayo <i>in silico</i> 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. ....	25
<b>Imagen 8.</b> A) Ensayo <i>in silico</i> 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/HisA. 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.....	25
<b>Imagen 9.</b> Mapa de la construcción pcDNA <i>alpha</i> . ....	26
<b>Imagen 10.</b> Transformación de <i>E. coli</i> TG1. A) <i>E. coli</i> TG1 sin transformar; B) <i>E. coli</i> TG1 transformada con el vector pcDNA 3.1 myc/His A digerido con Apal y NotI; C) <i>E. coli</i> TG1 transformada con un vector completo; D) <i>E. coli</i> TG1 transformada con la ligazón de pcDNA 3.1 myc/His A con el gen de interferón <i>alpha</i> aviar. ....	27

## RESUMEN

El interferón juega un papel importante en las primeras etapas de la inmunidad innata y adaptativa. Es secretado por casi todos los tipos celulares y se caracteriza por sus actividades antivirales y antitumorales, a través de la regulación del crecimiento celular y la activación inmunitaria. En Medicina humana, por ejemplo, el interferón se ha utilizado con éxito para tratar una gran variedad de enfermedades virales. En las aves se han identificado las tres familias de IFN: La familia del tipo I que incluyen al IFN alpha (IFN  $\alpha$ ) y IFN beta (IFN  $\beta$ ), la familia tipo II, que incluye el IFN *gamma* (IFN  $\gamma$ ) y la familia tipo III que está representado por el IFN lambda (IFN- $\lambda$ ). Sin embargo, a pesar de que en diversos trabajos de investigación se ha demostrado la efectividad en el control y modulación de la respuesta inmune contra agentes infecciosos ninguno de los interferones se emplea en forma comercial en las granjas avícolas, teniendo en cuenta que la industria farmacéutica no lo prepara en forma comercial.

El uso del interferón recombinante *alpha* y *gamma* solos o combinados para su producción a gran escala requiere un proceso de estandarización y una metodología que permita valorar y validar sus resultados cuando sean aplicados en forma experimental o comercial. En el presente trabajo se obtuvieron y purificaron los interferones aviares *alpha* y *gamma* y *simultáneamente* se realizó una búsqueda sistemática de estudios de investigación que demostraron la eficacia de los interferones *alpha* y *gamma*, en diferentes procesos infecciosos virales y no viales. Todo ello con la finalidad de establecer una discusión amplia sobre el uso del interferón en aves como un adyuvante para mejorar la respuesta inmune y lograr el control de infecciones virales, principalmente. Entre los resultados de esta revisión

se estima que la eficacia de la aplicación del interferón depende de la edad del ave, tipo de tratamiento, dosis, frecuencia, vía de administración y la sinergia con otras moléculas. Por lo que la producción de esta citocina, puede coadyuvar en la mejora de los tratamientos antivirales y potenciar el efecto de las vacunas para aves comerciales y de compañía.

**Palabras clave: Interferón, actividad antiviral, enfermedades, tratamiento.**

## I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) exhortó a los productores pecuarios a utilizar métodos alternativos a los antibióticos para controlar las enfermedades de los animales <sup>1</sup>. Ante esta situación, existe la necesidad de desarrollar nuevas terapias novedosas para combatir las infecciones virales y bacterianas en las aves. Aunque, actualmente hay vacunas disponibles para una gran variedad de enfermedades de las aves, es necesario buscar adyuvantes adecuados que aumenten la eficiencia de las vacunas. Esto considerando, que el empleo de nuevos adyuvantes asociados a las vacunas logren un aumento importante en la inmunogenicidad y por tanto, exista una mejor protección. Se sabe que algunos adyuvantes que no son citocinas tienen efectos importantes, debido a que su modo de acción probablemente está mediado por citocinas [1]. Entre los posibles modos de acción de los adyuvantes incluyen (1) producir un efecto de depósito de antígeno en el sitio de inoculación, (2) mejorar la presentación del antígeno a las células inmunocompetentes y (3) facilitar la producción de linfocinas inmuno-relevantes [2].

Las terapias con algunas citocinas de pollo se han investigado y se ha demostrado que tienen efectos positivos sobre la respuesta inmune en distintos modelos aviares. Sin embargo, el empleo y desarrollo de nuevas terapias con citosinas requiere conocimientos adicionales sobre su mecanismo de acción<sup>2</sup>, lo cual se ha facilitado gracias al conocimiento del genoma del pollo, ya que con ello se han podido identificar genes ortólogos de mamíferos <sup>3</sup>. En particular, se han identificado genes asociados que participan en la generación de la respuesta inmune innata y que se desconocía su presencia, y por otro lado, en los pollos existen un menor número de genes ortólogos de mamíferos <sup>4</sup>. Además, la elucidación de las vías de activación del interferón en los pollos se dificulta para realizar algunos trabajos por la falta de reactivos específicos para aves, debido a que la mayoría de los reactivos son para mamíferos y ello resulta en la falta de reactividad cruzada <sup>3</sup>.

### I.I. Antecedentes de los Interferones

Los interferones (IFNs) fueron descubiertos por separado por dos grupos de investigación en la década de 1950 y que llevan el nombre de la aptitud de estas

moléculas para interferir con la replicación viral del virus de la gripe en las células infectadas <sup>5,6</sup>. En las siguientes décadas, los IFNs se han estudiado con gran detalle, teniendo como uno de los primeros hallazgos que los interferones se producían en tejidos y células de diferentes especies de peces, anfibios, reptiles, aves, mamíferos, <sup>5,7</sup>.

### **I.II. Naturaleza de los IFN's**

Los IFN's son polipéptidos con secuencias de 180 aminoácidos aproximadamente, su peso molecular se encuentran entre 20 y 34 kDa., conformadas por cuatro *alpha* hélices y dos hojas  $\beta$  plegadas <sup>8</sup> y forman parte del grupo de las citocinas tipo II del sistema inmune.

Los IFNs actúan en las etapas tempranas de la inmunidad innata y también en la respuesta adaptativa; son secretados por casi todos los tipos de células; se caracterizan por su actividad antiviral y antitumoral, así como en la regulación del crecimiento celular y en la activación de la respuesta inmune <sup>5,9</sup>.

En la especie aviar se han identificado las tres familias de IFN: a) familia tipo I constituida por IFN  $\alpha/\beta$ . b) familia tipo II constituida por el IFN  $\gamma$ , c) familia tipo III representada por el IFN- $\lambda$  <sup>10</sup>.

Los IFN  $\alpha/\beta$  aviares son secretados por todas las células en respuesta directa a las infecciones por virus; sin embargo, el IFN  $\alpha$  es secretado principalmente por fagocitos mononucleares, y el IFN  $\beta$  por fibroblastos <sup>10</sup>.

Con respecto al interferón gama de pollo (ChIFN  $\gamma$ ), es la única molécula que representa a la clase tipo II, el cual se sintetiza por los linfocitos Th1 CD4., células supresoras citotóxicas CD8 y las células asesinas naturales (NK) en respuesta al reconocimiento de las células infectadas. Por otra parte, en las células normales aumenta la expresión de las moléculas del MHC clase I y en las células presentadoras de antígeno incrementa la expresión de moléculas MHC clase II; y mejora el papel auxiliar de las células T en la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B <sup>10</sup>.

El descubrimiento de IFN- $\lambda$  en humanos permitió la identificación de ChIFN- $\lambda$ , mientras que hay tres genes de IFN- $\lambda$  en humanos, solo parece existir un gen de IFN- $\lambda$  en los pollos <sup>11</sup>. El producto de este gen aviar parece estar distantemente relacionado tanto con los IFN de tipo I y en forma general su actividad antiviral se ha demostrado ser menor que las actividades de IFN de tipo I y de tipo II <sup>12</sup>.

### **I.III. Inducción de los interferones**

#### **I.III.I. Tipo I**

Los organismos eucarióticos poseen receptores específicos para el reconocimiento de estructuras conservadas en organismos patógenos. Existen tres clases de receptores asociados con la activación de las vías de interferón relacionados con el reconocimiento de ácidos nucleicos virales. La primer categoría de receptores de reconocimiento de patrones (PRR's por sus siglas en inglés) 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 (RIF-I) y el factor asociado a diferenciación de melanoma 5 (MDA5, por sus siglas en inglés)<sup>13</sup>. La segunda es la familia de los receptores tipo toll (TLR, por sus siglas en inglés) que incluyen TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, los cuales identifican PAMP's (Patrones moleculares asociados a patógenos) endosomales, fagosomales o extracelulares <sup>14</sup>. La tercera es la familia de los sensores del DNA, la cual incluye a la GMP-AMP sintasa cíclica (cGAS, por sus siglas en inglés) <sup>15</sup>. Al activarse, estos PRRs reclutan moléculas de señalización, las cuales resultan de manera directa o indirecta en la activación de factores reguladores de la transcripción del Interferón como el IFR3 y el IFR7, así como los factores de transcripción proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear Kappa Beta (NF- $\kappa\beta$ )<sup>13-16</sup>, los cuales inician la transcripción de los genes de IFN tipo I. Algunos PAMP's virales son, el ARN de doble cadena (ARNdc), el cual es reconocido por el receptor de tipo *toll* 3 (TLR3) en el endosoma, también es reconocido por el RIG-I y por MDA5 en el citoplasma <sup>17</sup>. De igual manera, el ARN de cadena simple o monocatenario (ARNmc) puede actuar como un PAMP, el TLR7 reconoce en el endosoma al ARNmc rico en guanina y uracilo <sup>18</sup>.

Las aves carecen del gen RIG-I y se ha propuesto que el MDA5 cumple las funciones de RIG-I <sup>19</sup>. De igual forma, los pollos también carecen del TLR9, que funciona como sensor de ADN viral, y en su lugar tienen el TLR21 que es su ortólogo funcional <sup>20</sup>.

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 adaptadoras 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 IKK  $\epsilon$  (inhibidor  $\epsilon$  de la cinasa NF-  $\kappa\beta$ ). En seguida las cinasas TBK1 e IKK  $\epsilon$  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, que requiere de proteínas adaptadoras MyD88 (proteína de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88) y TRAF3, para dirigir a la cinasa IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  y el NF- $\kappa\beta$  guía la transcripción de genes para citocinas proinflamatorias pero también mejora la expresión del gen de interferón <sup>21</sup>.

En el citoplasma, la detección del ARN 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/IKK $\epsilon$  e IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ . Estas cinasas activan IRF7 y NF-  $\kappa\beta$  respectivamente <sup>22</sup>.

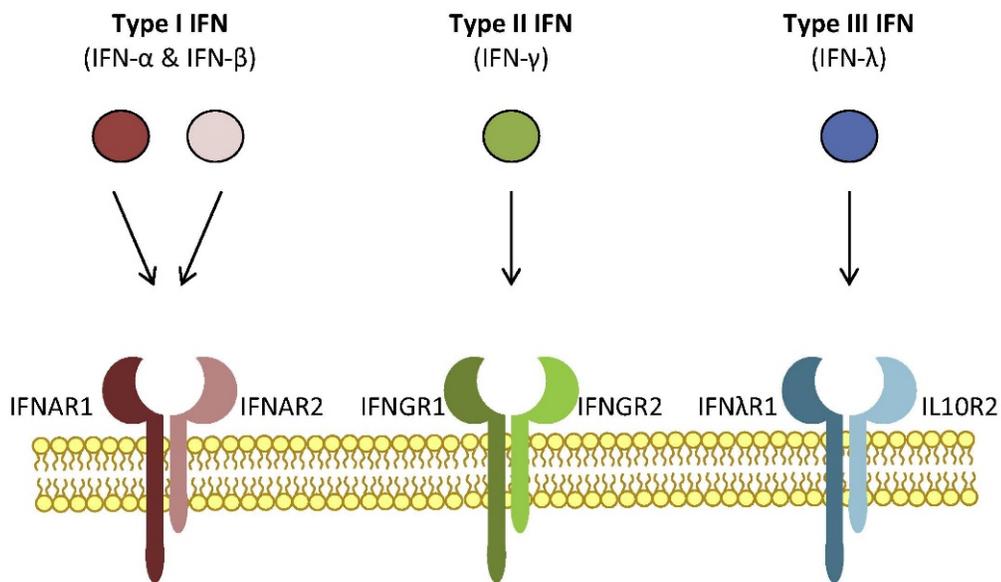
La detección de los patrones moleculares asociados a patógenos por los receptores de reconocimiento de patrones eventualmente culmina en la activación de IRF7, NF-  $\kappa\beta$  y AP-I, los cuales se unen a PRDI/III (Dominio de Regulación Positiva I/III), PRD II y PRD IV, respectivamente, e inducen la transcripción de los Interferones de tipo I y de las citocinas proinflamatorias como TNF, IL-6, IL-1-  $\beta$  <sup>23</sup>. Por consiguiente, el interferón de tipo I conduce a la activación transcripcional de varios ISG (genes estimulados por interferón) para montar un estado antiviral en la célula <sup>24</sup>.

### I.III.II. Tipo II

El IFN- $\gamma$  es producido por las células T cooperadoras Th1 CD4<sup>+</sup> y por casi todas las células CD8<sup>+</sup>, como resultado de la activación transcripcional inducida por la exposición a las células presentadoras de antígeno<sup>25</sup>. En las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes y de memoria, el promotor IFN- $\gamma$  está bajo el control de los elementos reguladores en cis y en trans, entendiéndose que los elementos en cis son regiones del ADN que regulan la transcripción de los genes cercanos y los elementos en trans son genes distantes a partir del gen por las que fueron transcritas, y ambos funcionan como sitios de unión para factores de transcripción<sup>26</sup>. Solo los elementos en trans se activan en las células CD8<sup>+</sup>, lo que conduce a una respuesta significativamente más débil que la observada en las células CD4<sup>+</sup>. Los elementos en cis se activan mediante complejos que contienen c-Jun y ATF-2, mientras que el elemento distal se activa mediante GATA-3 y ATF-1<sup>27,28</sup>. Los mecanismos de transducción de señales implicados en la activación de la transcripción del gen IFN- $\gamma$  no están totalmente caracterizados, pero involucran las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 y por la proteína quinasa activada por mitógeno JNK2 (MAP quinasa)<sup>29-31</sup>. La producción de IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo antigénico se mejora notablemente por IL-12 o IL-18, citocinas producidas por células presentadoras de antígeno activadas<sup>32</sup>. Aunque ni IL-12 ni IL-18 por sí solas pueden estimular la producción de IFN- $\gamma$  significativamente en las células T no estimuladas, juntas estas citocinas pueden estimular la producción de IFN- $\gamma$  de una manera independiente del antígeno<sup>33</sup>. Se desconoce la base molecular de esto, pero puede implicar la activación de STAT4 por IL-12 y NF- $\kappa$ B por IL-18, y también puede implicar una regulación al alza del receptor de IL-18 por IL-12<sup>34</sup>. El IFN- $\gamma$  también es producido por células NK activadas de manera independiente del antígeno y esto también depende de la producción de IL-12 por las células presentadoras de antígeno y es estimulado por IL-18<sup>35</sup>.

#### I.IV. Receptores de citocinas de clase II

La unión de una citocina a su receptor específico de la superficie celular activa varias vías de transducción de señales que conducen a la respuesta antiviral <sup>36</sup>. Los receptores de citocinas de clase II (CRF2) son receptores heterodiméros compuestos por dos subunidades de receptores, como son las cadenas R1 / R $\alpha$  y R2 / R $\beta$ , respectivamente. Como se muestra en la **Imagen 1**. Cada una de las familias de IFN emplean receptores distintos para señalizar, lo que da como resultado rutas de señalización diferente y, por lo tanto, existe variación en sus actividades biológicas. Los IFN de tipo I señalan a través del complejo IFNAR1 e IFNAR2 <sup>37</sup>, IFN- $\gamma$  se une al receptor de IFN tipo II, el complejo IFNGR1 e IFNGR2 <sup>38</sup>, mientras que los IFN tipo III se unen a un complejo único, IFN $\lambda$ R1 e IL10R2 <sup>11,36,39</sup>.

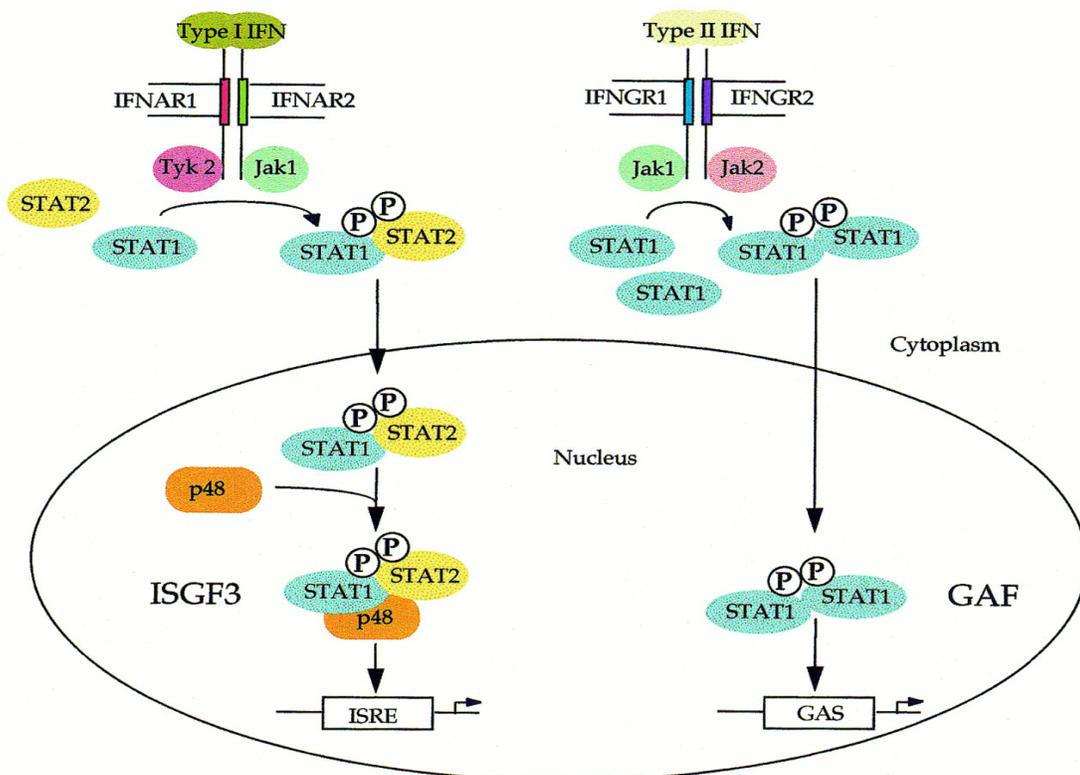


**Imagen 1.** Las familias de interferón y sus receptores afines. Las tres familias distintas de IFN en mamíferos, el tipo I, tipo II y tipo III, se unen a un complejo receptor de citocinas de clase II distinto. Todos los miembros de la familia IFN tipo I se unen a IFNAR1 e IFNAR2. El único miembro de la familia de IFN tipo II, IFN- $\gamma$ , se une a IFNGR1 e IFNGR2. Los IFN de tipo III se unen a la única subunidad IFN $\lambda$ R1 y a la subunidad IL10R2 multifuncional, que pueden asociarse con otras cadenas de citocinas R1 de clase II.

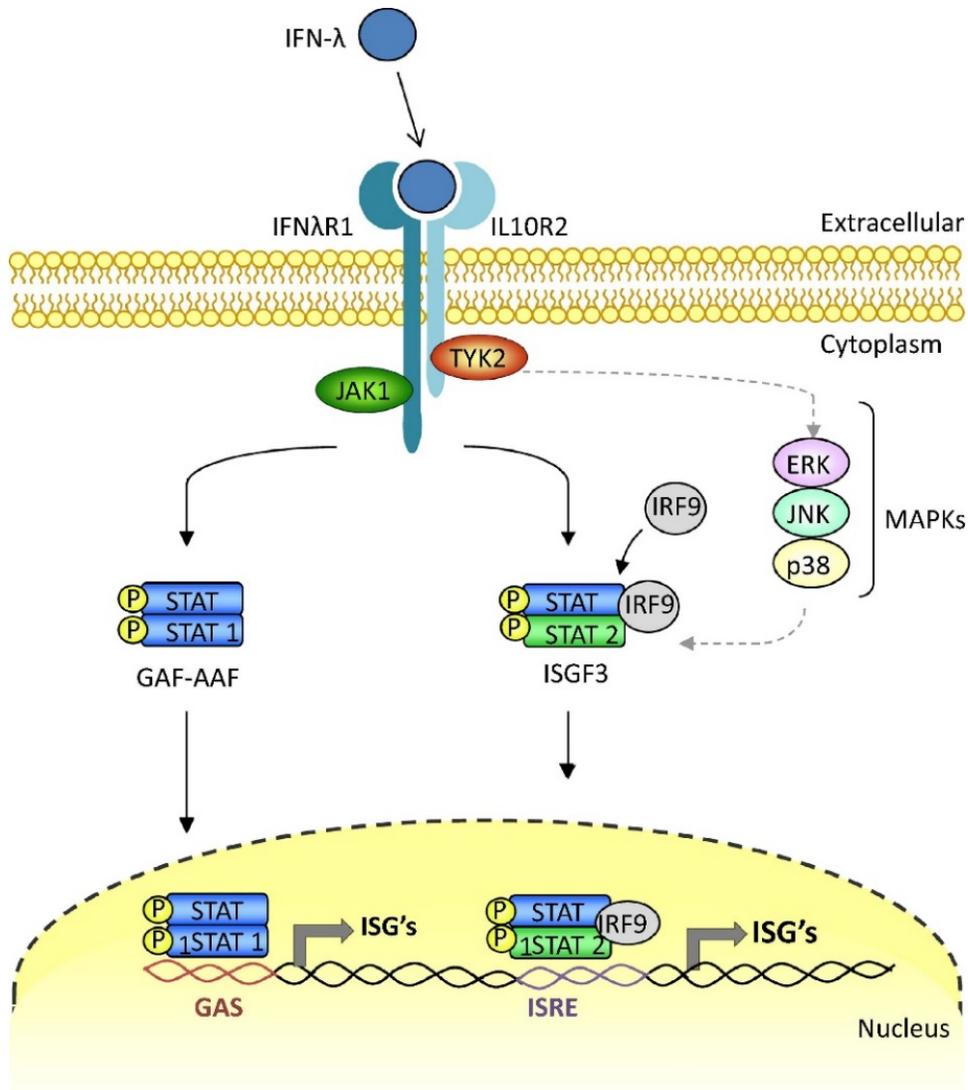
## I.V. Cascada de transducción de señales IFN

Las cascadas de transducción de señales se activan después del acoplamiento de un ligando a su receptor <sup>40,41</sup>. La vía de señalización de IFN está mediada predominantemente a través de la vía de Janus quinasa (Jak) y del transductor de señal y la activación de la transcripción (STAT) <sup>42</sup>. Los Jaks son tirosina quinasas no receptoras intracelulares, de las cuales hay cuatro miembros: Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2 <sup>43</sup>. Las quinasas Jak1 y Jak2 están involucradas en la señalización de IFN tipo II y Jak1 y Tyk2 están involucradas con la señalización de IFN tipo I y III, por lo que la unión de IFN- $\alpha$  /  $\beta$  o IFN- $\lambda$  activa Jak1 y Tyk2, que se asocian con IFNAR2 e IFNAR1, e IFNAR1 e IL10R2, respectivamente <sup>3,11,44</sup>. A pesar de que se utilizan diferentes complejos de receptores, existe una superposición de señales distintas entre los IFN de tipo I y III, por lo que los resultados antivirales son similares <sup>39,45</sup>.

La imagen 2 describe la ruta de señalización para IFN tipo I y tipo II, y la imagen 3 describe la ruta de señalización para IFN tipo III.



**Imagen 2.** Vías de señalización activadas por IFN- $\alpha$  /  $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Las actividades biológicas de los IFN se inician uniéndose a sus receptores afines. Esto conduce a la activación de tirosina quinasas asociadas a receptores. Estas quinasas fosforilan a los miembros de la familia STAT de factores de transcripción, que pueden ingresar al núcleo y, ya sea solos o en combinación con p48, se unen a los promotores de genes diana y provocan la activación transcripcional específica del gen.



**Imagen 3.** La vía de señalización de interferón tipo III. Los IFN de tipo III se unen a su receptor IFNλR1 / IL10R2 y señalizan a través de la vía Jak / STAT. La fosforilación ocurre después de la unión de IFN-λ, lo que conduce a que las proteínas STAT formen homodímeros o heterodímeros antes de la translocación al núcleo donde se unen a las regiones promotoras de los ISG.

## I.VI. Genes estimulados por interferón

Mediante el uso y análisis de microarreglos se han determinado con mayor precisión los efectos complejos que tienen los IFN en el perfil de expresión genética del huésped. Esto demostró que se activan muchos genes, denominados genes estimulados por IFN (ISG) <sup>46,47</sup>. De la multiplicidad de ISG identificados a partir de estos estudios, la mayoría no están caracterizados con respecto a sus mecanismos de acción y funciones antivirales<sup>48</sup>. Los ISG que han sido identificados y caracterizados, se ha demostrado que sus actividades antivirales son diversas y críticas para la respuesta inmune innata <sup>49</sup>. Muchos de estos ISG muestran múltiples funciones antivirales para interferir en diversos pasos del ciclo viral: desde la penetración del virus hasta su liberación <sup>50</sup>. Estos efectos antivirales se deben a la colaboración de múltiples ISG para prevenir, inhibir o localizar el patógeno invasor <sup>51</sup>. Los ISG clásicos se refieren a aquellos que han sido estudiados y caracterizados en mamíferos, por ejemplo: resistencia al mixovirus 1 (Mx), proteína quinasa R (PKR) y 2'-5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) <sup>52,53</sup>.

### I.VI.I. Proteínas de resistencia al mixovirus (Mx)

Las proteínas que son inducidas por IFN, durante la infección por el mx son GTPasas, que originan una serie de acciones antivirales contra una amplia gama de virus de ARN mediante el bloqueo de las primeras etapas del ciclo de replicación, endocitosis y apoptosis. (Receptores). <sup>52</sup>

### I.VI.II. Proteína quinasa R

A pesar de que la expresión de la proteína quinasa R es inducida por el IFN, también, es expresada en niveles basales en la mayoría de las células como un monómero inactivo, que se activa principalmente por la unión con ARN de doble cadena (ARNdc), lo que genera la dimerización y autofosforilación <sup>54-56</sup>. Una vez activada, se catalizan algunos sustratos proteicos; uno de ellos corresponde a la subunidad 2 $\alpha$  del factor iniciador de traducción células eucarióticas (eIF2  $\alpha$ ), que al ser fosforilado no puede cumplir su función e inhibe la traducción de proteínas <sup>57</sup>.

Además, esta ISG genera apoptosis al activar la caspasa 8 y autofagia a través del factor eIF2 $\alpha$  que activa la proteína asociada a microtúbulos LC3 <sup>58</sup>. Por otro lado, activa el IRF3, el NF-kB y el factor de la transcripción 2 (ATF2), que estimulan la expresión de los genes de los IFN tipo I <sup>59,60</sup>.

### **I.VI.III. 2'- 5'-oligoadenilato sintetasa**

La 2'- 5'-oligoadenilato sintetasa (OAS) es una enzima inducida por IFN, estimulada por dsRNA, para producir oligoadenilatos unidos en 2'- 5' (2-5A) a partir de ATP, que se une a la RNasa L, lo que resulta en la escisión de transcripciones de ARN virales y ARN huésped <sup>60,61</sup>.

Sin embargo, existen virus que utilizan una amplia variedad de mecanismos que bloquean la actividad antiviral de estas moléculas, como lo son el virus de influenza, virus de la hepatitis C, virus de la fiebre porcina africana, virus de la diarrea bovina, ciertos herpesvirus, entre otros<sup>24,62</sup>. Por ejemplo, uno del virus más estudiado es de la viruela (poxvirus), el cual tiene genoma de ADN y ejerce un control regulador sobre la respuesta inmune innata del huésped. Los poxvirus evaden la respuesta del interferón en casi todas las etapas: bloquean la inducción de interferones, evitan la activación de las vías NFkB e IRF-3, evitan la activación de la vía JAK-STAT e inhiben los mecanismos antivirales como el PKR <sup>63-65</sup>. Estos efectos están coordinados por proteínas virales, como la D9 y D10 que evitan la traducción de ARNm del interferón; la proteína E3 evita que la ARN polimerasa III detecte el ADN viral, lo que evita la producción de interferón. E3 también inhibe la activación de PKR y OAS. Existen varias proteínas derivadas del virus de viruela que previenen la activación de NFkB en casi todos los pasos de la vía de NFkB. La proteína C6 previene la activación de IRF-3 e IRF-7 impulsada por TBK1. Las proteínas B18 y B8 funcionan como receptores señuelo, actuando como trampas para los interferones de tipo 1 y tipo 2, respectivamente. La proteína VH1 del poxvirus es una fosfatasa que actúa desfosforilando STAT1 y STAT2. <sup>63,65</sup>

## I.VIII. Antecedentes

Actualmente, el interferón  $\alpha$  de pollo (ChIFN- $\alpha$ ) se ha demostrado como un agente antiviral eficiente en la respuesta a las infecciones inducidas por el Virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV). En el estudio realizado por Pei J., et al. (2004) demostraron que el ChIFN- $\alpha$  natural y el ChIFN- $\alpha$  recombinante, inhibieron la replicación del virus de la bronquitis infecciosa cepa Beaudette, en células de riñón de pollo (CKC) de una manera dependiente de la dosis. El IFN- $\alpha$  100 U / ml redujo la replicación viral en un 50% reduciendo la formación de sincitios. La protección óptima contra la enfermedad respiratoria inducida por IBV se obtuvo después de la administración intravenosa u oral de ChIFN administrada 1 día antes de la exposición al virus y cada uno de los 5 días posteriores. ChIFN-I protegió a los pollitos de la enfermedad clínica al retrasar la infección y disminuir su gravedad, lo que demuestra su potencial inmunitario <sup>63</sup>, y por parte del equipo de Lillehoj H.S. se usó IFN recombinante de tipo II para reducir la producción de oocistos y la pérdida de peso corporal después de la infección por *Eimeria acervulina* <sup>64</sup>. De esta manera podemos concluir que el uso de los IFN *alpha* y *gamma* como adyuvantes de vacuna son muy factibles para mejorar la protección de las aves ante diferentes agentes patógenos, por lo que se requiere de un sistema adecuado para producir y administrar la citocinas de manera confiable y económica para los productores.

## II. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antibióticos ha restringido su uso como agentes preventivos y terapéuticos lo que obliga a buscar nuevas alternativas para el control y tratamiento de las enfermedades infecciosas. Esta condición ha hecho necesario desarrollar nuevos métodos que mejoren la respuesta inmune para el control de las enfermedades, principalmente de origen viral. Por ello, el uso de los IFN aviares alpha y gamma recombinantes, son una alternativa ya que ofrecen las siguientes ventajas: 1.-No son específicos en contra de un solo virus; 2.-pueden limitar la replicación viral; 3.- ayudan en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa celular y humoral; 4.- los mecanismos virales anti interferón no tienen gran impacto sobre su acción, al compararse con los interferones producidos por el ave. Por otro lado, en la actualidad se busca el desarrollo de vacunas polivalentes 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, como son los costos de producción principalmente. Por lo que se propone estandarizar y mejorar los procesos de expresión y purificación para tener la posibilidad de llegar a una producción a escala industrial.

### III. HIPÓTESIS

El sistema de *E. coli* permite la expresión y purificación de los Interferones aviares *alpha* y *gamma* recombinantes para su adaptación a un escalamiento de producción industrial.

### I.V. OBJETIVO GENERAL

Purificar los interferones aviares *alpha* y *gamma* a través del sistema de ADN recombinante en *E. coli*.

#### IV.I. Objetivos específicos

1. Expresar y purificar los productos de los genes que codifican para los interferones *alpha* y *gamma* aviar.
2. Estandarizar los métodos de expresión y purificación para que en futuro se pueda manejar la producción de los interferones recombinantes a escala industrial.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### V.I. Genes de INF *alpha* y *gamma* aviar

Las secuencias de los genes de Interferón *alpha* e Interferón *gamma* aviar se obtuvieron de la base de datos del Centro Nacional Información Biotecnológica (NCBI; [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov)) con los número de acceso U07868.1 y P49708.1, respectivamente.

Se hizo la revisión de las secuencias para verificar la presencia de codones raros para *E. coli* y de sitios de restricción de enzimas utilizadas en el presente trabajo (NcoI y Apal., #ERO571 y #ER1411, Thermo Scientific).

### V.II. Optimización de las secuencias y construcción de los genes de interferón *alpha* y *gamma* aviar

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  $\geq 0.3$  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 Apal (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 DNA Builder 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); usando el termociclador Aektik Thermo Cycler (#TCA0096, Thermo Scientific).

En las primeras dos reacciones de ensamblaje, se utilizaron mezclas de oligonucleótidos con una concentración de 25  $\mu$ M. Y en la tercera reacción, que es de amplificación, se utilizaron las segundas reacciones de ensamblaje (sin ~~Edel~~ DNA) y los oligonucleótidos del gen de IFN $\alpha$  y gen de IFN gamma.

### **V.III. 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).

### **V.IV. Purificación de bandas del gel de agarosa**

Una vez obtenidas las bandas esperadas de 456y 489 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.

### **V.V. Clonación en el vector cloneJET**

Los genes de los IFN *alpha/gamma* 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 $\alpha$ / $\square$  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).

#### **V.VI. Purificación de DNA plasmídico**

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

#### **V.VII. Doble digestión**

Se realizó doble digestión del ADN plasmídico obtenido usando enzimas NcoI y ApaI. De cada una de las enzimas se utilizaron 10 U/µg 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 V.II.

#### **V.VIII. 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.

#### **V.IX. Digestión del vector**

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

#### **V.X. 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.

#### **V.XI. Purificación de DNA plasmídico.**

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

#### **V.XII. 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 $\alpha/\gamma$  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.

#### **V.XIII. 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.

## V.XIV. Inducción de la expresión

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

En medio LB se incubaron las *E. coli* BL21 sin transformar, y en medio LB con 150 µg/ml de ampicilinalas transformaciones durante toda la noche a 37°C/225 rpm.

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.

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

L21Star 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 n 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 *lon*, lo que reduce la degradación de proteínas recombinantes (Hernández 2014).

Para confirmar la presencia de los genes de los INF $\alpha/\gamma$  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.

Se realizó la optimización de las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican para los interferones *alpha* y *gamma* aviar, para su expresión como proteínas recombinantes en *E. coli*. Los cuales portan en su secuencia de ADN plásmidico, un promotor de expresión dependiente de L-arabinosa, genes con resistencia a ampicilina y genes para la síntesis de una cola de histidina.

### **V.XV. 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).

### **V.XVI. SDS-PAGE e Inmunotransferencia**

Se realizó la electroforesis de las proteínas en geles de poliacrilamida con una concentración del 12%. Cada carril del gel se cargó con 15 microlitros de proteína y 8 microlitros del marcador SDS PAGE Standards (Invitrogen); se corrió en cámara de electroforesis a 90 volts hasta que se pasará al gel concentrador y a 120 volts por aproximadamente 1 hora hasta que el frente de corrida llegará a la base del gel.

Se utilizó el marcador PageRuler Prestained Protein Ladder (#26616, Thermo Scientific). La electroforesis se realizó por duplicado, uno de los geles se tiñó en azul de Coomasie y el segundo gel se utilizó para la inmunotransferencia usando una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), la cual 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).

Se utilizó el siguiente protocolo para la inmunodetección: la membrana se lavó con PBS 1X al 0.05% y se puso en solución de bloqueo (20 mL de PBS 1X con albumina de suero de bovino al 2%) durante 30 minutos. Posteriormente se incubó 1 hora con anticuerpo de ratón policlonal anti-histidina en una dilución 1:500 en PBS Tween20 al 0.05% y 2% de BSA durante una hora. Después se añadió el anticuerpo secundario monoclonal anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Invitrogen) y se incubaron a temperatura ambiente. Se lavó la membrana con PBS Tween 20 al 0.05% dos veces por cinco minutos con agitación constante. Para el revelado se utilizó un kit de sustrato de diaminobencidina (DAB).

### **V.XVII. Obtención de las proteínas recombinantes solubles**

Se transfirieron las clonas de *E.coli* a 400 mL de medio liquido LB en el tiempo de exposición y concentración de L-arabinosa que anteriormente se determinaron con

mayor expresión de las proteínas. Posterior a la incubación, los medios de cultivo se centrifugaron y se eliminaron los sobrenadantes y las pastillas se resuspendieron en PBS refrigerado. Las pastillas resuspendidas fueron sometidas a una lisis celular por sonicación y subsecuentemente a una lisis química con urea (2-4 M urea or guanidine-HCl). Finalmente, se centrifugaron (tiempo y rpm) para obtener fracciones solubles por el rompimiento de los cuerpos de inclusión.

#### **V.XVIII. Purificación mediante cromatografía de afinidad**

Las fracciones solubles se cargaron en una columna Ni-NTA (Qiagen) para que, por afinidad, las proteínas recombinantes (con tallos de histidina) se quedaran adheridas al níquel. Posteriormente se hicieron lavados con solución amortiguadora de equilibrio (formula o marca). Después de los lavados se les agregó la solución amortiguadora de elución que contiene una concentración alta de imidazol (SigmaAldrich) con el fin de poder despegar a las proteínas de las columnas.

#### **V.XIX. Cuantificación de Proteínas**

Se prosiguió a obtener una valoración de la concentración de proteínas por el método Bradford. Se manejo el protocolo de este método, el cual está basado en la afinidad de las proteínas por el azul de Coomassie. Donde se usó como proteína de referencia a la albumina.

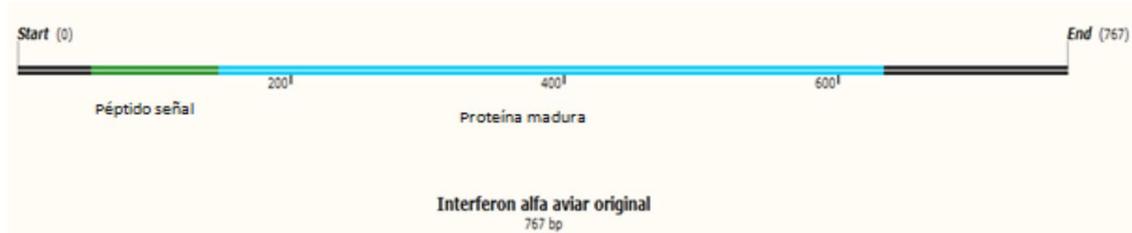
#### **V.XX. Electroforesis bidimensional e Inmunoblot.**

Las muestras de proteínas se cargarán en un gel poliacrilamida y con ello se procederá a un ensayo de electroforesis bidimensional para separar a las proteínas recombinantes con base a su punto isoeléctrico y de esta manera descartar a otras proteínas con el mismo tamaño. Posteriormente, las proteínas contenidas en gel se transferirán eléctricamente a una membrana de Nitrocelulosa. Luego, la membrana se bloqueará con solución de albúmina de suero bovino al 1% a temperatura ambiente, y después se incubarán con anticuerpo monoclonal anti-histidina. Finalmente, se añadirá el anticuerpo secundario monoclonal anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante y se incubarán a temperatura ambiente. La reacción de color se observará usando un kit de sustrato de diaminobencidina (DAB). En este ensayo se visualizará la presencia de las proteínas tras las purificaciones, de una forma cualitativa estimar el rendimiento.

## VI. RESULTADOS

### VI.I. Análisis de las secuencias

El gen de interferón *alpha* 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 (imagen 4).



**Imagen 4.** Secuencia original del gen de interferón *alpha* aviar; tomado del GenBank con número de acceso U07868.1

### Secuencia Optimizada

Se optimizó la secuencia del interferón *alpha* 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 ApaI y NotI (Imagen 5)



**Imagen 5.** Secuencia optimizada del gen de interferón *alpha* aviar, con los sitios de restricción NotI y ApaI a los flancos. (SnapGene)

## VI.II. 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 (Imagen 6)

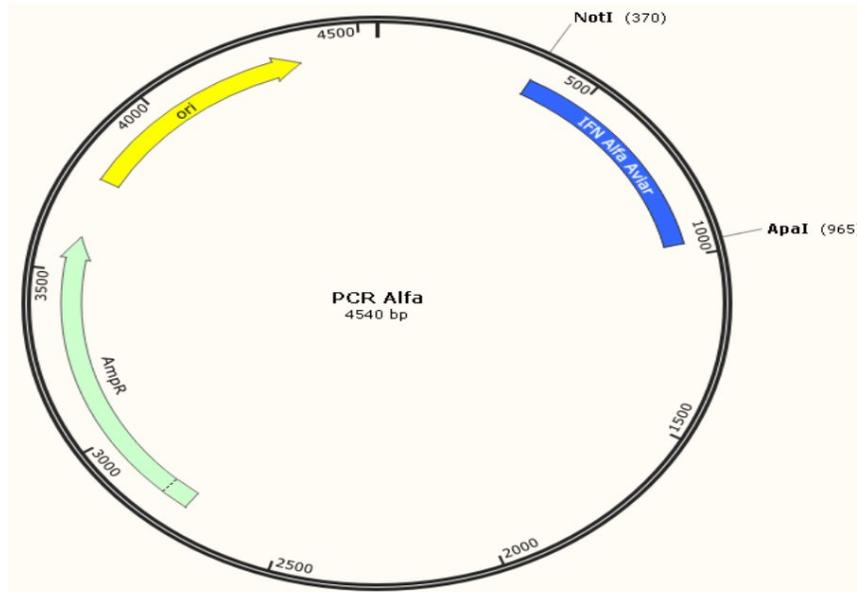
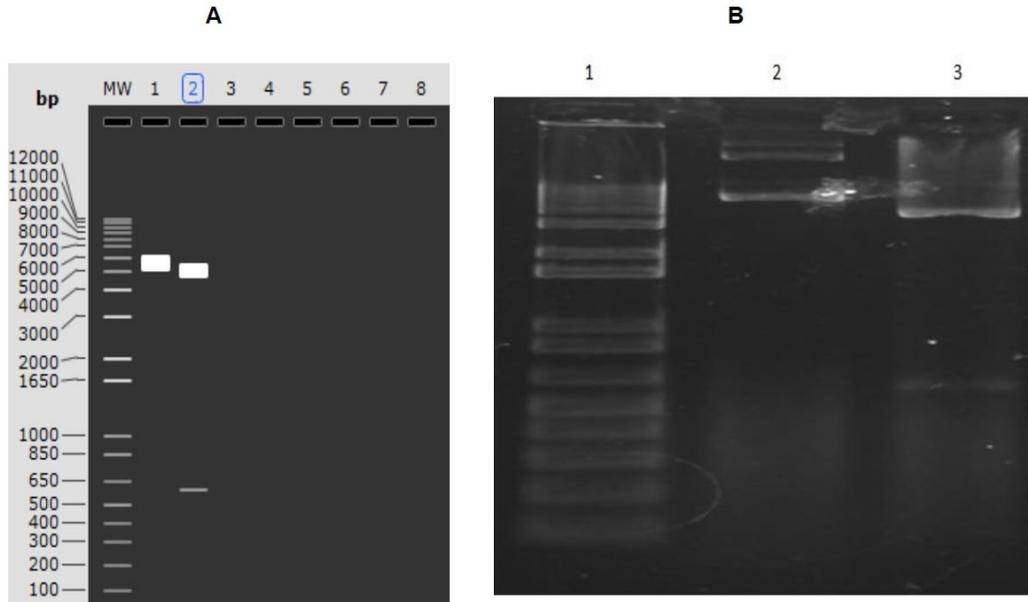


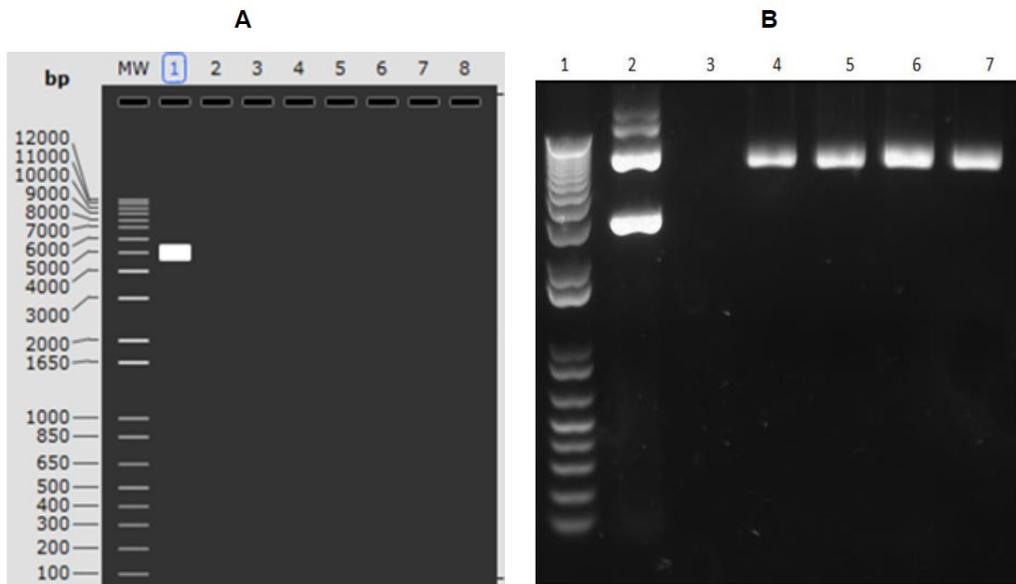
Imagen 6. Mapa del vector pCR con el gen de interferón *alpha* aviar optimizado (SnapGene)

## VI.III. Doble digestión de pCR IFNChikay subclonación en el vector de expresión para células eucariontes pcDNA3.1 myc/His A

La construcción pCR IFNChikaal 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 (Imagen 7a y b y 8a y b).

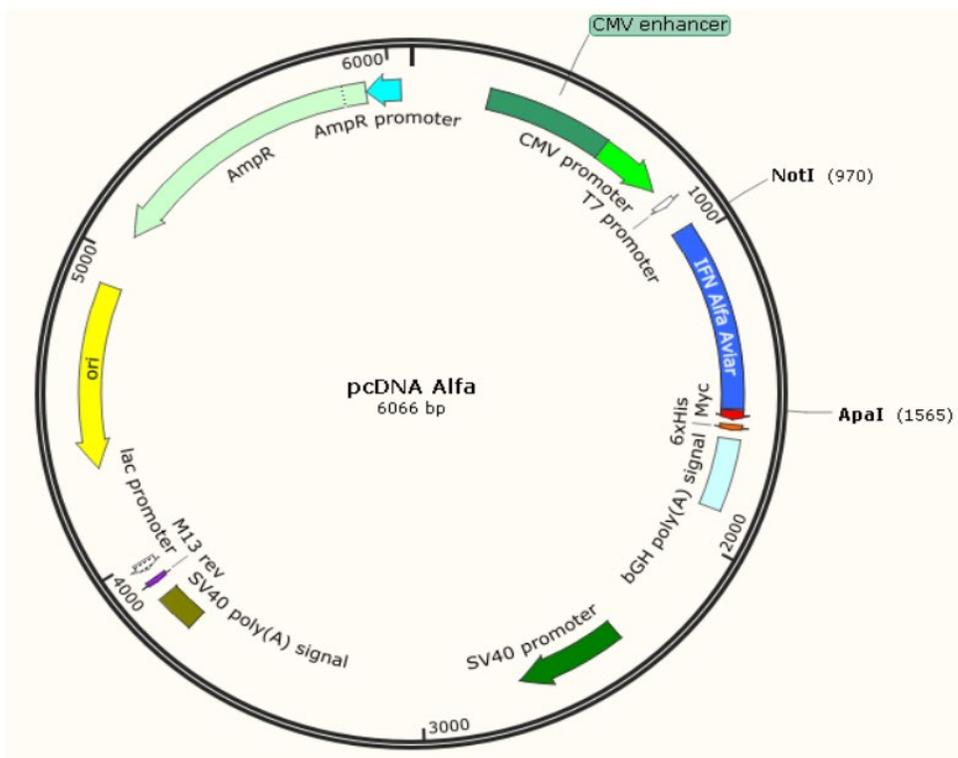


**Imagen 7.** A) Ensayo *in silico* de la digestión con Apa I y Not I de pCR IFNChika (Snap Gene). Carril MW: 1 Kb Plus DNA Ladder; Carril 1: pCR IFNChika sin digerir; Carril 2: pCR IFNChika digerido con Apa I y Not I. B) Electroforesis en gel de agarosa de la doble digestión de pCR IFNChika. Carril 1: 1 Kb Plus DNA Ladder; Carril 2: pCR IFNChika sin digerir Carril 3: pCR IFNChika digerido con NotI y ApaI.



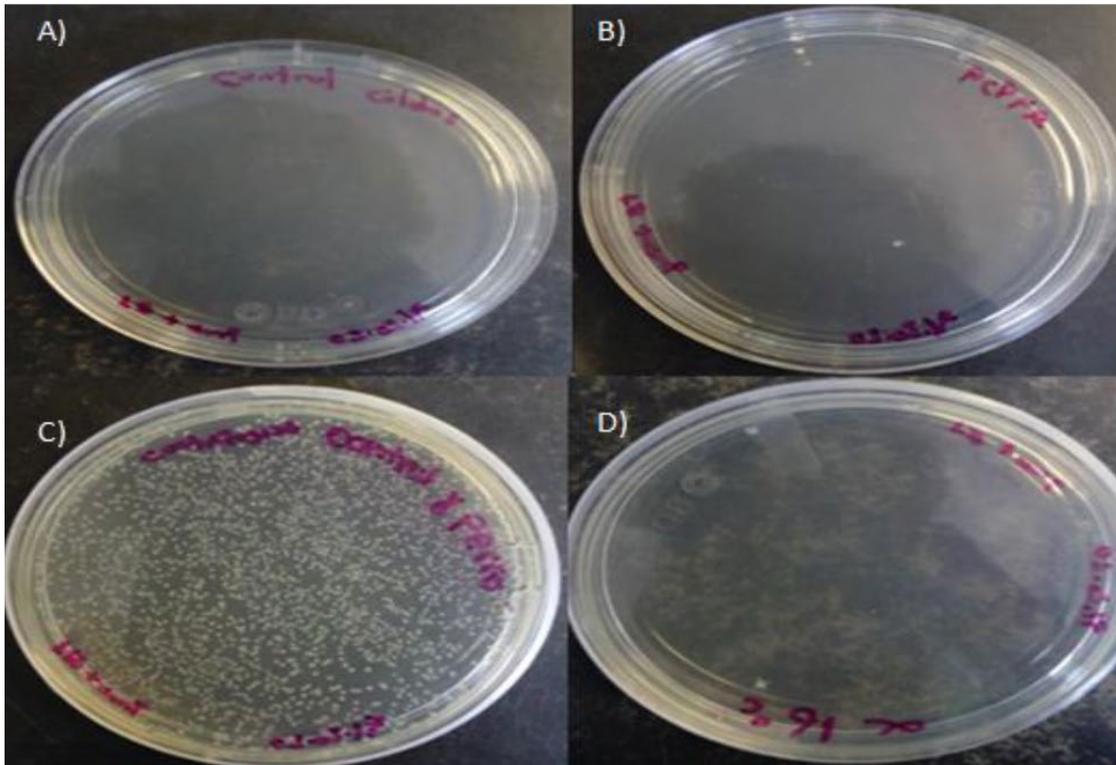
**Imagen 8.** A) Ensayo *in silico* de la doble digestión de pcDNA3.1 myc/His A. Carril MW: 1Kb Plus DNA Ladder; Carril 1: doble digestión con ApaI y NotI de pcDNA3.1 myc/HisA. B) Electroforesis en gel de agarosa de la doble digestión de pcDNA 3.1 myc/His A. Carril 1: 1 Kb Plus DNA Ladder; Carril 2: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

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 *alpha*, 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 *alpha* (Imagen 10). Imagen 9. Mapa de la construcción pcDNA *alpha*. La construcción se transformó en *E. coli* TG1 al igual que los controles pcDNA3.1 myc/HisA digerido con NotI y Apal y un plásmido íntegro con la resistencia a ampicilina, posteriormente se sembraron en medio LB con ampicilina junto con un control de células (Imagen 9).



**Imagen 9.** Mapa de la construcción pcDNA *alpha*.

La construcción se transformó en *E. coli* TG1 al igual que los controles pcDNA3.1 myc/His A digerido con NotI y Apal y un plásmido íntegro con la resistencia a ampicilina, posteriormente se sembraron en medio LB con ampicilina junto con un control de células (Imagen 10).



**Imagen 10.** 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 *alpha* aviar.

#### **VI.IV. 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.

## VII. DISCUSIÓN

El uso de citosinas recombinantes en medicina veterinaria, se ha analizado en numerosos estudios de las diversas enfermedades infecciosas y en general, se ha demostrado su eficiencia para mejorar la inmunidad del huésped en contra de las mismas y así mismo, se ha demostrado su utilidad en pruebas diagnósticas.

En los primeros estudios, el interferon se comenzó a utilizar aun cuando no se tenía una clara clasificación; ya que está empieza a establecerse a partir del conocimiento de diferentes factores, entre los que destacan el tipo de receptor al cual es afin cada interferon (Goossens et al., 2013).

El uso del interferon *alpha* y *gamma*, se ha empleado con éxito en múltiples proyectos de investigación, por ejemplo, se utilizó la vacunación in ova con el virus de Newcastle adicionado con el IFN *alpha* o *gamma* recombinante y los resultados demostraron un importante efecto protector ante el desafío con el virus de campo. (Rautenschlein et al., 1999) Estos resultados se complementan con otro estudio, donde se produjo oxido nitrico (ON) el cual tiene efecto antiviral (Yeh et al., 1999). También se ha demostrado que el INF tipo I de pavo estimula la producción de ON en macrófagos (Suresh et al., 1995).

Es de considerar que uso del IFN *alpha* y el IFN *gamma* recombinante, pueden actuar de dieferente manera contra el virus del sarcoma de Rous, por ejemplo el IFN *alpha* y el IFN *gamma* *actuan cada uno en una etapa especifica del desarrollo tumoral.*(Plachý et al., 1999).

Así mismo, en otro estudio donde se emplearon el IFN *alpha* y *gamma* recombinantes, en infecciones contra coccidias, se observó que IFN *alpha* protegió significativamente contra la perdida de peso en los pollos, mientras que IFN *gamma* redujo de manera significativa la carga parasitaria (Min et al., 2001), por lo que, otros estudios contra coccidias también coinciden que el IFN *gamma* tiene una respuesta efectiva antiparasitaria (Lillehoj & Choi, 1998; Lowenthal et al., 1995; J. Xu et al., 2012)

También se determino si la eficacia de los interferones aviares no se veía afectada si eran utilizados entre aves filogeneticamente cercanas, para ello se utilizó

interferon *alpha* recombinante de pollo sobre cultivos de fibroblasto de embrion de pollo, pavo y pato, y desafiados con virus de influenza aviar, obteniendo que efectivamente, el interferon entre estas aves mostraba actividad biologicamente activa sin importar la distancia filogenetica(Jiang et al., 2011), eso se complementa con otros estudios donde en el primero utilizó interferon *gamma* recombinante de pollo en modelo de pavo(Rautenschlein et al., 1999) y en el segundo se utilizo interferon *gamma* de paloma en modelo de pollo, ambos con buenos resultados (Shen et al., 2015).

Los antibioticos se han usado durante años en la industria pecuaria bajo el nombre de promotores de crecimiento, sin embargo, estas practicas han sido eliminadas en diferentes paises por razones de resistencia.(Dibner & Richards, 2005) Por lo tanto, se sabe que hay moléculas que por su naturaleza actuan mejor como tratamientos profilacticos o terapeuticos, considerando esto último, se realizó el estudio donde se comparó el uso profiláctico y terapeutico del interferón *gamma* de pato contra la infección con el virus de la hepatitis B; los resultados fueron que el interferón *gamma* de pato como tratamiento profiláctico inhibió de forma importante la replicación y como tratamiento terapeutico redujo los efectos patogénicos del virus de la hepatitis tipo B (Schultz & Chisari, 1999).

También se ha demostrado una protección significativa con el uso del interferón *alpha* como tratamiento terapeutico en pollos de 1 día de edad al ser desafiados con el virus de la bursitis infecciosa (Mo et al., 2001). En el año 2011, se publicó un estudio donde se demuestra que los pollos de una semana de edad responden bien al tratamiento terapeutico y los pollos a partir de la cuarta semana de edad, responden mejor a un tratamiento profilactico, esto debido a que el inmune de los pollos de 4 semanas de edad es más eficiente que el de pollos de 7 días de edad y, por lo tanto, las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I) podrían estar eficientemente reguladas positivamente.(Meng et al., 2011)

La vía de administración de los farmacos, es importante desde el punto de vista económico cuando se trata de su aplicación en grandes poblaciones (Anjum et al., 2020; Jin et al., 2015; Khodayari & Feizi, n.d.; Steitz et al., 2010). En la industria

avícola es muy importante encontrar la vía idónea de administración de los medicamentos en la medida que deben ser medicados muchos animales simultáneamente; Por eso se han realizado trabajos donde los resultados indican que la vía oral es la más apropiada para administrar los interferones sin importar la edad del pollo (Anjum et al., 2020; Jarosinski et al., 2001; Marcus et al., 1999; Mo et al., 2001; Rahman et al., 2012). En comparación con la vía intramuscular o intravenosa, el interferon llega a niveles séricos altos a los pocos minutos de su aplicación pero su concentración sérica baja rápidamente, lo que favorecería la infección viral, por lo que la administración oral u ocular, permite que el interferon tenga un efecto prolongado y por lo tanto, sea eficaz principalmente contra los virus que utilizan como vía de entrada las mucosas del ave (Mo et al., 2001). Sin embargo, una desventaja es que para tener un efecto protector más efectivo se requieren dosis altas y de aplicación frecuente y su costo de producción experimental es elevado (Anjum et al., 2020; Marcus et al., 1999; Min et al., 2001; Mo et al., 2001; Schultz & Chisari, 1999).

Los resultados del presente trabajo demostraron que es factible lograr expresar y purificar los interferones recombinantes mediante un sistema estandarizado de ADN recombinante en *E. coli* que puede ser adaptado para su producción a escala comercial y a costo competitivo.

## VIII. CONCLUSIÓN

Los resultados experimentales observados en diferentes estudios, nos indican la eficacia que tienen los interferones aviar *alpha* y *gamma* recombinantes ante infecciones que afectan a las aves de producción y de compañía. Su aplicación en combinación con vacunas u otros agentes estimulantes como citocinas o el levamizol, resultan en una mayor estimulación del sistema inmune y por ende en una mayor protección del huésped. Así finalmente, se justifica el desarrollo y aplicación de los interferones recombinantes para mejorar los tratamientos antivirales, tanto para aves comerciales y de compañía.

Es factible lograr la producción comercial de los interferones a través de la aplicación del sistema de ADN recombinante en *E. coli* adaptado para tal propósito.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Rahman MM, Uyangaa E, Han YW, et al. Oral co-administration of live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing chicken interferon- $\alpha$  and interleukin-18 enhances the alleviation of clinical signs caused by respiratory infection with avian influenza virus H9N2. *Vet Microbiol.* 2012;157(3-4):448-455. doi:10.1016/j.vetmic.2011.12.029
2. Blecha F. Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2001;17(3). doi:10.1016/S0749-0720(15)30010-4
3. Goossens K, Ward A, Lowenthal J, Bean A. Chicken interferons, their receptors and interferon-stimulated genes. *Dev Comp Immunol.* 2013;41(3).
4. Kaiser P. Advances in avian immunology--prospects for disease control: a review. *Avian Pathol.* 2010;39(5):309-324. doi:10.1080/03079457.2010.508777
5. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *J Interferon Res.* 1987;7(5):429-438. doi:10.1089/jir.1987.7.429
6. Nagano T, Kojima T. Pouvoir immunisant du virus vaccinal inactive par des rayons ultraviolets. *Compt Rend Soc Biol.* 1954;148:1700-1702. Accessed September 6, 2019. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10019492287/>
7. Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20047-20051. doi:10.1074/jbc.R700004200
8. Pavón L, Jiménez MC, Álvares ME. *Inmunología Molecular, Celular y Traslacional.* Wolters Kluwer; 2016. Accessed September 28, 2019. <https://www.laleo.com/inmunologia-molecular-celular-traslacional-p-20560.html>
9. Fields BN, Knipe DM (David M, Howley PM, Griffin DE. *Fields Virology:*

- Interferons and Other Cytokines*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2001. Accessed September 9, 2019. <https://www.worldcat.org/title/fields-virology/oclc/45500371>
10. Tizard I. *Inmunología Veterinaria*. Elsevier España; 2019. Accessed September 28, 2019. <https://www.laleo.com/inmunologia-veterinaria-p-23889.html>
  11. Donnelly RP, Kotenko S V. Interferon-lambda: A new addition to an old family. *J Interf Cytokine Res*. 2010;30(8):555-564. doi:10.1089/jir.2010.0078
  12. Feng M, Zhang N, Xie T, et al. Chichen type III interferon produced by silkworm bioreactor induces ISG expression and restricts ALV-J infection in vitro. *Appl Microbiol Biotechnol*. Published online August 29, 2019. doi:10.1007/s00253-019-10090-z
  13. Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *BioFactors*. 2009;35(1):14-20. doi:10.1002/biof.6
  14. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*. 2008;89(1):1-47. doi:10.1099/vir.0.83391-0
  15. Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Innate immune sensing of DNA viruses. *Virology*. 2011;411(2):153-162. doi:10.1016/j.virol.2011.02.003
  16. Baron S, Tying SK, Fleischmann WR, et al. The Interferons. *JAMA*. 1991;266(10):1375. doi:10.1001/jama.1991.03470100067035
  17. Rasmussen SB, Reinert LS, Paludan SR. Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense. *APMIS*. 2009;117(5-6):323-337. doi:10.1111/j.1600-0463.2009.02456.x
  18. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science (80- )*. 2004;303(5663):1526-1529. doi:10.1126/science.1093620

19. Karpala AJ, Stewart C, McKay J, Lowenthal JW, Bean AGD. Characterization of chicken Mda5 activity: regulation of IFN- $\beta$  in the absence of RIG-I functionality. *J Immunol*. 2011;186(9):5397-5405. doi:10.4049/jimmunol.1003712
20. Roach JC, Glusman G, Rowen L, et al. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9577-9582. doi:10.1073/pnas.0502272102
21. Kindler E, Thiel V, Weber F. Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response. *Adv Virus Res*. 2016;96:219-243. doi:10.1016/BS.AIVIR.2016.08.006
22. Belgnaoui SM, Paz S. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(5):564-572. doi:10.1016/J.COI.2011.08.001
23. Kim TH, Zhou H. Functional Analysis of Chicken IRF7 in Response to dsRNA Analog Poly(I:C) by Integrating Overexpression and Knockdown. Polyak SJ, ed. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133450. doi:10.1371/journal.pone.0133450
24. Goodbourn S, Randall RE, Didcock L. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol*. 2000;81(10):2341-2364. doi:10.1099/0022-1317-81-10-2341
25. Young HA. Regulation of Interferon- $\gamma$  Gene Expression. *J Interf Cytokine Res*. 1996;16(8):563-568. doi:10.1089/jir.1996.16.563
26. Aune TM, Penix LA, Rincón MR, Flavell RA. Differential transcription directed by discrete gamma interferon promoter elements in naive and memory (effector) CD4 T cells and CD8 T cells. *Mol Cell Biol*. 1997;17(1):199-208. doi:10.1128/mcb.17.1.199
27. Penix LA, Sweetser MT, Weaver WM, Hoeffler JP, Kerppola TK, Wilson CB. The proximal regulatory element of the interferon-gamma promoter mediates

- selective expression in T cells. *J Biol Chem*. 1996;271(50):31964-31972. doi:10.1074/jbc.271.50.31964
28. Zhang F, Wang DZ, Boothby M, Penix L, Flavell RA, Aune TM. Regulation of the activity of IFN-gamma promoter elements during Th cell differentiation. *J Immunol*. 1998;161(11):6105-6112. Accessed October 5, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834094>
  29. Rincon M, Enslin H, Raingeaud J, et al. Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J*. 1998;17(10):2817-2829. doi:10.1093/emboj/17.10.2817
  30. Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, et al. Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity*. 1998;9(4):575-585. doi:10.1016/s1074-7613(00)80640-8
  31. Lu H-T, Yang DD, Wysk M, et al. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3(Mkk3)-deficient mice. *EMBO J*. 1999;18(7):1845-1857. doi:10.1093/emboj/18.7.1845
  32. Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K. Regulation of interferon- $\gamma$  production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol*. 1998;10(3):259-264. doi:10.1016/S0952-7915(98)80163-5
  33. Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1 $\beta$  for IFN- $\gamma$  production from human T cells. *Int Immunol*. 2000;12(2):151-160. doi:10.1093/intimm/12.2.151
  34. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol*. 1998;161(7):3400-3407. Accessed October 5, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759857>
  35. Singh SM, Yanagawa H, Hanibuchi M, Miki T, Okamura H, Sone S. Augmentation by interleukin-18 of MHC-nonrestricted killer activity of human peripheral blood mononuclear cells in response to interleukin-12. *Int J*

- Immunopharmacol.* 2000;22(1):35-43. doi:10.1016/s0192-0561(99)00062-4
36. Kotenko S V., Langer JA. Full house: 12 Receptors for 27 cytokines. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(5):593-608. doi:10.1016/j.intimp.2004.01.003
37. Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uzé G. The Type I Interferon Receptor: Structure, Function, and Evolution of a Family Business. *J Interf Cytokine Res.* 1999;19(10):1069-1098. doi:10.1089/107999099313019
38. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. THE IFN $\gamma$  RECEPTOR:A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997;15(1):563-591. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.563
39. Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: Overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(1):33-48. doi:10.1016/j.cytogfr.2003.10.001
40. Leung S, Qureshi SA, Kerr IM, Darnell JE, Stark GR, Stark GR. Role of STAT2 in the alpha interferon signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 1995;15(3):1312-1317. doi:10.1128/mcb.15.3.1312
41. Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(2):211-217. doi:10.1016/S0955-0674(00)00199-X
42. Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Schreiber RD. HOW CELLS RESPOND TO INTERFERONS. *Annu Rev Biochem.* 1998;67(1):227-264. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.227
43. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VET, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol.* 2004;5(12). doi:10.1186/gb-2004-5-12-253
44. Karaghiosoff M, Neubauer H, Lassnig C, et al. Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity.* 2000;13(4):549-560. doi:10.1016/S1074-7613(00)00054-6

45. Zhou Z, Hamming OJ, Ank N, Paludan SR, Nielsen AL, Hartmann R. Type III Interferon (IFN) Induces a Type I IFN-Like Response in a Restricted Subset of Cells through Signaling Pathways Involving both the Jak-STAT Pathway and the Mitogen-Activated Protein Kinases. *J Virol.* 2007;81(14):7749-7758. doi:10.1128/jvi.02438-06
46. De Veer MJ, Sledz CA, Williams BRG. Detection of foreign RNA: Implications for RNAi. *Immunol Cell Biol.* 2005;83(3):224-228. doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01337.x
47. Sen GC, Sarkar SN. The Interferon-Stimulated Genes: Targets of Direct Signaling by Interferons, Double-Stranded RNA, and Viruses. In: *Interferon: The 50th Anniversary.* Springer Berlin Heidelberg; 2007:233-250. doi:10.1007/978-3-540-71329-6\_12
48. Schoggins JW, Rice CM. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol.* 2011;1(6):519-525. doi:10.1016/j.coviro.2011.10.008
49. Sadler AJ, Williams BRG. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):559-568. doi:10.1038/nri2314
50. Sen GC. Viruses and Interferons. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55(1):255-281. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.255
51. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their Actions. *Annu Rev Biochem.* 1987;56(1):727-777. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.003455
52. Haller O, Kochs G, Weber F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18(5-6):425-433. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.06.001
53. Sadler A, Williams BRG. Structure and Function of the Protein Kinase R. In: *Interferon: The 50th Anniversary.* Springer Berlin Heidelberg; 2007:253-292. doi:10.1007/978-3-540-71329-6\_13

54. Nallagatla SR, Toroney R, Bevilacqua PC. Regulation of innate immunity through RNA structure and the protein kinase PKR. *Curr Opin Struct Biol.* 2011;21(1):119-127. doi:10.1016/j.sbi.2010.11.003
55. Nakamura T, Furuhashi M, Li P, et al. Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase Links Pathogen Sensing with Stress and Metabolic Homeostasis. *Cell.* 2010;140(3):338-348. doi:10.1016/j.cell.2010.01.001
56. Clemens MJ. PKR - A protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(7):945-949. doi:10.1016/S1357-2725(96)00169-0
57. Balachandran S, Roberts PC, Brown LE, et al. Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity.* 2000;13(1):129-141. doi:10.1016/S1074-7613(00)00014-5
58. Williams BRG. PKR; A sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene.* 1999;18(45):6112-6120. doi:10.1038/sj.onc.1203127
59. García MA, Meurs EF, Esteban M. The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. *Biochimie.* 2007;89(6-7):799-811. doi:10.1016/j.biochi.2007.03.001
60. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):778-809. doi:10.1128/CMR.14.4.778-809.2001
61. Silverman RH. Viral Encounters with 2',5'-Oligoadenylate Synthetase and RNase L during the Interferon Antiviral Response. *J Virol.* 2007;81(23):12720-12729. doi:10.1128/jvi.01471-07
62. Devasthanam AS. Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. *Virulence.* 2014;5(2):270-277. doi:10.4161/viru.27902
63. Perdiguero B, Esteban M. The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J Interf Cytokine Res.* 2009;29(9):581-598. doi:10.1089/jir.2009.0073

64. Sánchez-Sampedro L, Perdiguero B, Mejías-Pérez E, García-Arriaza J, Di Pilato M, Esteban M. The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses*. 2015;7(4):1726-1803. doi:10.3390/v7041726
65. Smith GL, Benfield CTO, Maluquer de Motes C, et al. Vaccinia virus immune evasion: Mechanisms, virulence and immunogenicity. *J Gen Virol*. 2013;94(PART 11):2367-2392. doi:10.1099/vir.0.055921-0
66. *World Organisation for Animal Health (OIE). Manual Terrestre de La OIE. Viruela Aviar.*; 2018.
67. Pei J, Sekellick MJ, Marcus PI, Choi IS, Collisson EW. Chicken interferon type I inhibits infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness. *J Interf Cytokine Res*. 2001;21(12):1071-1077. doi:10.1089/107999001317205204
68. Lillehoj HS, Choi KD. Recombinant Chicken Interferon-Gamma-Mediated Inhibition of *Eimeria tenella* Development in vitro and Reduction of Oocyst Production and Body Weight Loss Following *Eimeria acervulina* Challenge Infection. *Avian Dis*. 1998;42(2):307. doi:10.2307/1592481
69. Animals NRC (US) C for the U of the G for the C and U of L. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Published online 2011. doi:10.17226/12910
70. Rojo A. Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. Valoración de las incidencias. ANIMALES DE LABORATORIO. Published July 2014. Accessed November 12, 2020. [https://www.uib.cat/digitalAssets/303/303729\\_2014\\_animaleslaboratorio\\_num62\\_31\\_33.pdf](https://www.uib.cat/digitalAssets/303/303729_2014_animaleslaboratorio_num62_31_33.pdf)
71. Rautenschlein S, Sharma JM, Winslow BJ, McMillen J, Junker D, Cochran M. Embryo vaccination of turkeys against Newcastle disease infection with recombinant fowlpox virus constructs containing interferons as adjuvants. *Vaccine*. 1999;18(5-6):426-433. doi:10.1016/S0264-410X(99)00254-6

72. Yeh HY, Winslow BJ, Junker DE, Sharma JM. In vitro effects of recombinant chicken interferon-gamma on immune cells. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19(6):687-691. doi:10.1089/107999099313848
73. Suresh M, Karaca K, Foster D, Sharma JM. Molecular and functional characterization of turkey interferon. *J Virol.* 1995;69(12):8159-8163. doi:10.1128/jvi.69.12.8159-8163.1995
74. Plachý J, Weining KC, Kremmer E, et al. Protective effects of type I and type II interferons toward Rous sarcoma virus-induced tumors in chickens. *Virology.* 1999;256(1):85-91. doi:10.1006/viro.1999.9602
75. Min W, Lillehoj HS, Burnside J, Weining KC, Staeheli P, Zhu JJ. Adjuvant effects of IL-1beta, IL-2, IL-8, IL-15, IFN-alpha, IFN-gamma TGF-beta4 and lymphotactin on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vaccine.* 2001;20(1-2):267-274. Accessed November 14, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567773>
76. Xu J, Peng J, Tao J. Interferon-gamma enhance immune response and efficacy of recombinant subunit vaccine against *Eimeria tenella* in chickens. *J Anim Vet Adv.* 2012;11(23):4394-4400. doi:10.3923/javaa.2012.4394.4400
77. Lowenthal JW, Digby MR, York JJ. Production of interferon-gamma by chicken T cells. *J Interferon Cytokine Res.* 1995;15(11):933-938. doi:10.1089/jir.1995.15.933
78. Jiang H, Yang H, Kapczynski DR. Chicken interferon alpha pretreatment reduces virus replication of pandemic H1N1 and H5N9 avian influenza viruses in lung cell cultures from different avian species. *Virology.* 2011;8. doi:10.1186/1743-422X-8-447
79. Shen SY, Chang WC, Yi HH, et al. Development of a subunit vaccine containing recombinant chicken anemia virus VP1 and pigeon IFN- $\gamma$ . *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;167(3-4):200-204. doi:10.1016/j.vetimm.2015.08.002

80. Lasso P, Gomez-Cadena A, Urueña C, et al. Prophylactic vs. Therapeutic Treatment With P2Et Polyphenol-Rich Extract Has Opposite Effects on Tumor Growth. *Front Oncol.* 2018;8(AUG):356. doi:10.3389/fonc.2018.00356
81. Lee DH, Jeon YS, Park CK, Kim S, Lee DS, Lee C. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets. *Arch Virol.* 2015;160(9):2197-2207. doi:10.1007/s00705-015-2494-z
82. Garbuglia AR, Lapa D, Sias C, Capobianchi MR, Del Porto P. The Use of Both Therapeutic and Prophylactic Vaccines in the Therapy of Papillomavirus Disease. *Front Immunol.* 2020;11:188. doi:10.3389/fimmu.2020.00188
83. Ferenczy MW. Prophylactic vaccine strategies and the potential of therapeutic vaccines against herpes simplex virus. *Curr Pharm Des.* 2007;13(19):1975-1988. doi:10.2174/138161207781039779
84. Asboe D, Pozniak A. Antiviral therapy. In: *Infectious Diseases: Third Edition.* Vol 2. Elsevier Inc.; 2010:1033-1042. doi:10.1016/B978-0-323-04579-7.00100-3
85. Davis JL, Papich MG. Antimicrobial Therapy. In: *Equine Infectious Diseases: Second Edition.* Elsevier Inc.; 2013:571-584.e5. doi:10.1016/B978-1-4557-0891-8.00065-8
86. GARROD LP, SCOWEN EF. THE PRINCIPLES OF THERAPEUTIC USE OF ANTIBIOTICS. *Br Med Bull.* 1960;16(1):23-28. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a069786
87. Zamarin D, Palese P. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: Old challenges and new directions. *Future Microbiol.* 2012;7(3):347-367. doi:10.2217/fmb.12.4
88. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. In: *Poultry Science.* Vol 84. Poultry Science Association;

2005:634-643. doi:10.1093/ps/84.4.634

89. Schultz U, Chisari F V. Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. *J Virol.* 1999;73(4):3162-3168. Accessed November 14, 2019.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10074168>
90. Schijns VE, Weining KC, Nuijten P, Rijke EO, Staeheli P. Immunoadjuvant activities of E. coli- and plasmid-expressed recombinant chicken IFN-alpha/beta, IFN-gamma and IL-1beta in 1-day- and 3-week-old chickens. *Vaccine.* 2000;18(20):2147-2154. doi:10.1016/s0264-410x(99)00537-x
91. Mo CW, Cao YC, Lim BL. The in vivo and in vitro Effects of Chicken Interferon a on Infectious Bursal Disease Virus and Newcastle Disease Virus Infection. *Avian Dis.* 2001;45(2):389. doi:10.2307/1592978
92. Meng S, Yang L, Xu C, et al. Recombinant chicken interferon- $\alpha$  inhibits H9N2 avian influenza virus replication in vivo by oral administration. *J Interf Cytokine Res.* 2011;31(7):533-538. doi:10.1089/jir.2010.0123
93. Khodayari M, Feizi A. *EVALUATION OF DIFFERENT ROUTES OF VACCINATION BY CLONE VACCINE ON HUMORAL ANTIBODY RESPONSE.*
94. Anjum FR, Rahman SU, Aslam MA, Qureshi AS. Comparative Study of Protection against Newcastle Disease in Young Broilers Administered Natural Chicken Alpha Interferon via Oral and Intramuscular Routes. *mSphere.* 2020;5(4). doi:10.1128/msphere.00585-20
95. Jin JF, Zhu LL, Chen M, et al. The optimal choice of medication administration route regarding intravenous, intramuscular, and subcutaneous injection. *Patient Prefer Adherence.* 2015;9:923-942.  
doi:10.2147/PPA.S87271
96. Steitz J, Wagner RA, Bristol T, Gao W, Donis RO, Gambotto A. Assessment of route of administration and dose escalation for an adenovirus-based

- influenza A virus (H5N1) vaccine in chickens. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(9):1467-1472. doi:10.1128/CVI.00180-10
97. Marcus PI, Van Der Heide L, Sekellick MJ. Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon- $\alpha$  ameliorates newcastle disease. *J Interf Cytokine Res.* 1999;19(8):881-885. doi:10.1089/107999099313406
98. Jarosinski KW, Jia W, Sekellick MJ, Marcus PI, Schat KA. Cellular responses in chickens treated with IFN- $\alpha$  orally or inoculated with recombinant Marek's disease virus expressing IFN- $\alpha$ . *J Interf Cytokine Res.* 2001;21(5):287-296. doi:10.1089/107999001300177475
99. Song B, Li X, Ma J, et al. Prokaryotic Expression and Anti-IBDV Activity of Chicken Interleukin-18 and Interferon- $\gamma$ ; *Cytogenet Genome Res.* 2017;153(1):36-45. doi:10.1159/000481522
100. Yin J, Jin H, Yang F, et al. Synergistic effects of adjuvants interferon-gamma and levamisole on DNA vaccination against infection with Newcastle disease virus. *Viral Immunol.* 2007;20(2):288-299. doi:10.1089/vim.2006.0108