



Obtención de la molécula interferón alfa canino (IFN- α C) recombinante expresada en *Escherichia coli*, como alternativa al tratamiento de infecciones virales.

Villavicencio Acurio, Carla Johana

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, M. Sc.

21 de agosto del 2020

Hoja de resultados de la herramienta Urkund

URKUND**Document Information**

Analyzed document Carla Villavicencio Urkund.docx (D78008264)
Submitted 8/21/2020 4:28:00 AM
Submitted by
Submitter email cjvillavicencio@espe.edu.ec
Similarity 0%
Analysis address tiramos.espe@analysis.orkund.com

Sources included in the report





DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**Obtención de la molécula interferón alfa canino (IFN- α C) recombinante expresada en *Escherichia Coli*, como alternativa al tratamiento de infecciones virales**" fue realizada por la señorita **Villavicencio Acurio, Carla Johana** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 21 de agosto de 2020



Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel M. Sc.
DIRECTORA
C.C. 1753960028



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Villavicencio Acurio, Carla Johana**, con C.C.: 0504065293, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Obtención de la molécula interferón alfa canino (IFN- α C) recombinante expresada en *Escherichia coli*, como alternativa al tratamiento de infecciones virales** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 21 de agosto de 2020



Villavicencio Acurio, Carla Johana
C.C. 0504065293



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Autorización de Publicación

Yo, **Villavicencio Acurio, Carla Johana**, con C.C.: 0504065293, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Obtención de la molécula interferón alfa canino (IFN- α C) recombinante expresada en *Escherichia coli*, como alternativa al tratamiento de infecciones virales"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 21 de agosto de 2020



Villavicencio Acurio, Carla Johana
C.C. 0504065293

Dedicatoria

A Dios, que siempre me acompaña y con sus bendiciones me ha sabido guiar durante toda mi vida.

A mi madre, que ha sido la base y motivación principal para cumplir con este objetivo, que con su paciencia, consejos, amor y apoyo incondicional me ha acompañado en este largo caminar.

A mi hermano, que, a pesar de las diferencias y muestras de cariño singulares, ha sido un pilar fundamental en mi vida y en mi formación personal.

A mis abuelitos, Luis y Mercedes, que con sus consejos han encaminado mi vida, guiándome siempre hacia mi superación personal.

A mi princesa Sofía, que, con su ternura y amor, supo alegrar cada día de mi vida desde su llegada.

Finalmente, a mi tío abuelo Gustavo, que desde el cielo siempre me ha acompañado y ha velado por mi bienestar.

Carla Johana Villavicencio Acurio

Agradecimiento

A mi madre, que con su trabajo y amor ha logrado sacar a sus hijos adelante, siendo mi mayor inspiración y ejemplo de vida. A Héctor que ha sido como un padre y un gran apoyo en la familia.

A mi hermano y toda mi familia, que siempre estuvieron motivándome para no desmayar y seguir en la lucha de este largo camino.

A la Dra. Thelvia Ramos, que además de guiarme académicamente, con sus consejos y experiencias marcó en mí un crecimiento profesional y personal.

Al Profesor Jorge Toledo, por permitirme realizar esta investigación dentro su laboratorio, y dejarme ser parte de su valioso equipo de trabajo.

A Nicolás Gutiérrez y Angela Hidalgo, por asesorarme durante todo el proceso de elaboración de esta investigación; y principalmente por su apoyo y cariño durante toda mi estadía en el laboratorio.

A Valeria y Katherine, que, con su amistad, hicieron que mi estadía durante toda mi vida universitaria sea más llevadera y llena de múltiples experiencias, risas y amor.

A mis amigos Luis, Fernando, Santiago, Carlos, Bryan, Lineth, Vanessa, Andrea, Daniela, y todos quienes estuvieron apoyándome durante este largo caminar.

Finalmente, a todos quienes forman parte del LBB de la Universidad de Concepción; especialmente a: Paula, Leonardo, Mary, Félix y Bryan; por tolerar todas mis ocurrencias y por haberme dado tanto cariño haciéndome sentir como en casa.

Carla Johana Villavicencio Acurio

Índice de contenidos

Certificado del Director	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de contenidos	8
Índice de figuras	12
Abreviaturas	13
Resumen	15
Abstract	16
Capítulo 1.....	17
Introducción	17
Formulación del problema y antecedentes.....	17
Justificación del problema	19
Objetivos del proyecto.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
Capítulo 2.....	23
Marco teórico	23

Interferón	23
Tipos de interferón	23
IFN tipo I y actividad antiviral	25
Interferón alfa canino	27
Afecciones virales caninas y sus tratamientos con IFN tipo I	27
Producción de proteínas recombinantes	29
<i>Escherichia coli</i> como sistema de expresión	30
Capítulo 3	32
Metodología	32
Producción de proteínas recombinantes	32
Cepa bacteriana y plásmido	32
Transformación bacteriana por shock térmico	32
Cultivo y crecimiento en matraz	33
Cultivo y crecimiento en fermentador	34
Ruptura de biomasa y aislamiento de cuerpos de inclusión (CI)	35
Lavado de cuerpos de inclusión de IFN-α canino recombinante	35
Solubilización de cuerpos de inclusión	36
Renaturalización por diálisis	36
Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	36
Electro transferencia de proteínas	37

	10
<i>Western Blot</i>	37
Análisis de la actividad biológica del interferón	37
PCR en tiempo real– análisis de genes antivirales de IFN- α C.....	38
Capítulo 4	39
Resultados	39
Trasformación bacteriana	39
Selección del medio de cultivo	40
Fermentaciones en medio de cultivo TB autoinducido	45
Solubilización de cuerpos de inclusión de IFN- α C.....	47
Renaturalización de IFN- α C.	48
Análisis de la actividad biológica de IFN- α C por qPCR.....	50
Capítulo 5	52
Discusión	52
Capítulo 6	57
Conclusiones	57
Recomendaciones	58
Capítulo 7	59
Bibliografía	59

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Composición de medios de cultivo líquidos</i>	34
Tabla 2. <i>Programa de amplificación para la PCR en tiempo real</i>	38
Tabla 3. <i>Relación intensidad de banda/ biomasa de los diferentes medios de cultivo</i>	41
Tabla 4. <i>Crecimiento celular de E. coli BL21 transformada con el vector pET IFN-αC en medios de cultivo LB autoinducido y TB autoinducido</i>	43
Tabla 5. <i>Comparación del rendimiento de los medios LB y TB autoinducidos en fermentaciones de 1L</i>	44
Tabla 6. <i>Evaluación del peso seco de las fermentaciones en medio TB autoinducido</i>	45
Tabla 7. <i>Cuantificación del proceso de renaturalización de IFN-αC, cálculo de pureza y porcentaje de rendimiento</i>	50

Índice de figuras

Figura 1. <i>Vía de señalización del interferón tipo I</i>	26
Figura 2. <i>Identificación del clon productor de IFN-αC</i>	40
Figura 3. <i>Relación intensidad de banda/ biomasa de los diferentes medios de cultivo</i>	41
Figura 4. <i>Selección del medio de cultivo</i>	42
Figura 5. <i>Curva de crecimiento celular de E. coli BL21 transformada con el vector pET IFN-αC</i> ... 43	
Figura 6. <i>Comparación del rendimiento de los medios LB y TB autoinducidos en fermentaciones de 1L</i>	44
Figura 7. <i>Curva de crecimiento de bacteria productora de IFN-αC en medio de cultivo TB autoinducido</i>	45
Figura 8. <i>SDS-PAGE de la expresión bacteriana en la producción de IFN-αC</i>	46
Figura 9. <i>Solubilización de los cuerpos de inclusión de IFN-αC</i>	48
Figura 10. <i>Renaturalización de la proteína IFN-αC</i>	49
Figura 11. <i>Cuantificación de IFN-αC, mediante curva de BSA</i>	49
Figura 12. <i>Análisis de la expresión del ARNm de genes antivirales</i>	51

Abreviaturas

IFN	Interferón
IFN-αC	Interferón alfa canino recombinante
PKR	Proteína quinasa R
OAS-1	2'-5' oligoadenilato sintetasa 1
OAS-2	2'-5' oligoadenilato sintetasa 2
ZAP	Proteína antiviral de dedo de zinc
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
NK	Natural killer
IL-1	Interleucina 1
MHC 1	Complejo de histocompatibilidad mayor de tipo 1
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
ISGF3	Gen estimulado por interferón factor 3
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
IFNAR	Receptor de IFN- α
JAK1	Janus quinasa 1
TYK2	Tirosina quinasa 2
IRF9	Factor regulador de interferón 9
ISGF3	Gen estimulado por interferón 3
ISRE	Elementos de respuesta estimulada por interferón
GAS	Secuencias activadas por gamma
eIF2α	Factor de iniciación de la traducción eucariota 2 subunidad 1
RNasaL	Ribonucleasa L
CDV	Virus del moquillo canino

CPV	Parvovirus canina
CIV	Virus de la influenza canina
tag	Etiquetas moleculares
LB	Luria- Bertani
TB	Terrific Broth
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
rpm	Revoluciones por minuto
CI	Cuerpos de inclusión
PBS	Tampón fosfato salino
TBS	Tris <i>buffer</i> salino
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
SFB	Suero fetal bovino
ARN	Ácido ribonucleico
BCA	Ácido bicinconínico
DO	Densidad óptica
μ	Velocidad de crecimiento
μg	Microgramos
ng	Nanogramos
μL	Microlitros
mL	Mililitros
h	Horas

Resumen

Los interferones (IFN), son una familia de citoquinas importantes dentro de la activación y regulación de las respuestas inmunes innata y adaptativa. Permiten la transcripción de cientos de genes con actividad antiviral y antiproliferativa. El IFN- α perteneciente a los IFNs tipo I, posee múltiples aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de diversas enfermedades de origen viral, tanto en humanos como en animales. En el campo veterinario se conoce que el 2,5% de las muertes en perros son ocasionados por infecciones virales. Hasta el momento no se conoce un tratamiento adecuado para enfermedades como el distemper, la rabia o la parvovirus. Los tratamientos existentes permiten únicamente mitigar los síntomas, pero no combaten con el agente causal de la enfermedad.

En el presente trabajo se realizó una producción de IFN- α canino (IFN- α C) recombinante en un sistema de expresión de *Escherichia coli* BL21 *codon plus*, en donde se obtuvo la proteína como cuerpos de inclusión con un porcentaje de pureza del 83,84%. El replegamiento de la proteína se llevó a cabo con una solubilización en urea 8M y β -mercaptoetanol, y una posterior renaturalización por diálisis en PBS y sucrosa, obteniendo un rendimiento de 0,56 g/L de cultivo. Se determinó la existencia de actividad biológica con la utilización del IFN- α C producido, sobre células MDCK, en donde se observó un aumento del ARNm en los marcadores antivirales: proteína kinasa R (PKR) y 2',5'-Oligoadenilato Sintetasa 2 (OAS-2).

Palabras Clave:

- **INTERFERÓN**
- **ESCHERICHIA COLI**
- **PROTEÍNA RECOMBINANTE**

Abstract

Interferons (IFN) are an important family cytokine for the activation and regulation of innate and adaptive immune responses. They allow the transcription of hundreds of genes with antiviral and antiproliferative activity. IFN- α , that belong to type I IFNs, has multiple therapeutic applications in the treatment of various diseases of viral origin, both in humans and animals. In the veterinary field it is known that 2.5% of deaths in dogs are caused by viral infections. So far there is no known adequate treatment for diseases such as distemper, rabies or parvovirus. Existing treatments allow only to mitigate the symptoms, but they do not fight with the causative agent of the disease.

In the present work, a production of recombinant canine IFN- α (IFN- α C) was performed using *Escherichia coli* BL21 codon plus as the expression system the protein obtained was in the form of inclusion bodies with a purity percentage of 83.84 %. Refolding of the protein was carried out with a solubilization in 8M urea and β -mercaptoethanol, and a subsequent renaturation by dialysis in PBS and sucrose, obtaining a yield of 0.56 g / L of culture. The existence of biological activity was determined with the use of the IFN- α C produced on MDCK cells, where an increase in the mRNA was observed in the antiviral markers: protein kinase R (PKR) and 2', 5'-Oligoadenylate Synthetase 2 (OAS-2).

Key words:

- **INTERFERÓN**
- **ESCHERICHIA COLI**
- **RECOMBINANT PROTEIN**

Capítulo 1

Introducción

Formulación del problema y antecedentes

Los interferones (IFN) fueron descubiertos por primera vez en Japón en el año 1954 por Nagano y Kojima como un factor inhibidor de virus (Nagano & Kojima, 1954). En 1957 Isaacs y Lindenmann lo identificaron como una sustancia responsable de la interferencia vírica, tras observar que los sobrenadantes de células tomadas de cultivos celulares infectados producían una proteína, la cual permitía que otras células se volvieran resistentes a virus de otro tipo (Isaacs & Lindenmann, 1957). Años más tarde se descubrió que el interferón era una familia de proteínas sintetizadas por células eucariotas en respuesta a la presencia de diversos patógenos; tales como virus, bacterias, parásitos y células tumorales (Imanishi, 2004; Miorin, Maestre, Fernandez-Sesma, & García-Sastre, 2017; tenOever, 2016).

Los interferones se encuentran directamente relacionadas en la regulación y activación tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa. Existen tres diferentes tipos de interferones clasificados de acuerdo a su estructura y función: tipo I, II y III (Ashnagar et al., 2014).

El interferón alfa (IFN- α), un miembro perteneciente a la familia de IFN tipo I, posee una alta actividad antiviral, antiproliferativa e inmunoreguladora, razón por la cual ha sido utilizado en diferentes tratamientos clínicos contra enfermedades virales (Lombardi, Tsomos, Hammerstad, & Tomer, 2018). Actualmente, el IFN- α se usa con éxito para el tratamiento de enfermedades tales como la hepatitis B, hepatitis C, virus del herpes, virus del papiloma humano y algunos tipos de cáncer en humanos (Asim et al., 2017; Hasselbalch & Holmström, 2019; Klotz, Baumgärtner, & Gerhauser, 2017; Landolfo, Gribaudo, Angeretti, & Gariglio, 1995). Asimismo, su aplicación en infecciones virales de animales es amplia como: el

tratamiento de virus del herpes bovino, el virus de la leucemia y el virus de la inmunodeficiencia en gatos; y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (Babiuk, Lawman, & Gifford, 1987; Klotz et al., 2017).

A nivel mundial, la principal causa de muerte en perros jóvenes es la infección viral, pues poseen un sistema inmune inmaduro que no les permite generar resistencia ante virus o bacterias (Fleming, Creevy, & Promislow, 2011). El 2,5% de muertes en perros, en Latinoamérica, son producidas por enfermedades asociadas a infecciones virales, dentro de las que destacan enfermedades como la parvovirus, rabia, influenza canina, papilomatosis, distemper, hepatitis canina, entre otras (J. Duque et al., 2019; Y. Duque, Echeverri, Trejos, & Ruiz, 2017; Lobetti, 2007; Rey, 2010; Smith et al., 2019; Thaiwong et al., 2018; P. Zhou, Zeng, Zhang, & Li, 2017). Por lo que es importante desarrollar un tratamiento alternativo que permita disminuir la tasa de mortalidad en perros, causada por dichos procesos infecciosos (Gamble et al., 2018; Klotz et al., 2017).

En Ecuador, las enfermedades que afectan a los perros son en su gran mayoría el distemper y la parvovirus (Aldaz, García, & Quiñonez, 2015; Barros, 2015). Estas enfermedades pueden ser prevenidas con un proceso de vacunación adecuado, que debe realizarse dentro de las primeras etapas de vida de las mascotas. Sin embargo, los costos oscilan entre los \$50 y \$200, al ser tan elevados, impiden que este proceso se lleve a cabo; por lo que los perros se convierten en animales vulnerables ante posibles infecciones con esos virus (Aldaz, García, & Quiñones, 2012; Inga, 2018). Además de resultar costosos, los tratamientos para enfermedades virales, se enfocan únicamente en aliviar los síntomas de la enfermedad, pero no eliminan el agente causal, el virus (Aldaz, 2014).

Al comparar el valor económico del uso de antibióticos convencionales frente a una terapia usando interferón, se observa que existe una reducción del 50% en costos al utilizar estos últimos (Dixon, Walters, Turner, & Hancock, 2006; Shepherd et al., 2007; Stadtmauer &

Cunningham-Rundles, 1997). Cabe recalcar que dentro del mercado nacional veterinario, hasta el momento no se conoce ningún tipo de tratamiento para las enfermedades de origen viral para la población canina (Barros, 2015; Inga, 2018). Los medicamentos que se suministran a los animales solo controlan los síntomas, pero no combaten el virus por completo (Chen et al., 2010; Jiang et al., 2010). En países de la región como Chile se sabe que los servicios veterinarios utilizan medicamentos producidos para humanos como el interferón alfa u otros como es el caso del interferón omega felino, los cuales no poseen ningún tipo de acreditación por parte de la autoridad competente (Céspedes, Cruz, & Navarro, 2010; S. fang Li et al., 2017). Al tener en cuenta estos datos, es de importancia la creación de fármacos para el tratamiento antiviral diseñado exclusivamente para perros, evitando levantar una respuesta inmune adversa en el animal (Gershwin, 2018).

Con estos antecedentes, se propone obtener interferón alfa canino recombinante, que pueda ser usado específicamente en perros, para el tratamiento de infecciones de tipo viral.

Justificación del problema

Los perros domésticos (*Canis lupus familiaris*), son considerados importantes dentro de la sociedad, ya que aproximadamente el 60% de la población tiene al menos una mascota (Ghasemzadeh & Namazi, 2015). Debido a la amplia interacción que estos tienen con los seres humanos; además de servir como protección y compañía, se conoce que una mascota permite disminuir el estrés, mejorar y estimular el desarrollo infantil e incluso pueden ser un soporte para personas con discapacidad (Gómez, 2018). En Latinoamérica seis de cada diez hogares poseen un perro como mascota, en el año 2018 se analizó que la mantención de estos generan gastos anuales de 1.73 mil millones de dólares, dicha cifra destinada para el cuidado de la salud de los animales (Rios, 2019).

Las enfermedades infecciosas en perros han constituido una gran problemática debido a que su incidencia ha ido aumentando progresivamente (Aldaz, 2014; Prittie, 2004), esto es importante en el ámbito económico, pero su mayor relevancia yace en las posibles consecuencias zoonóticas que estas pueden generar (Day, 2016). Los perros pueden transmitir múltiples enfermedades virales y bacterianas a humanos por diferentes vías de contacto, por lo que el control de las mismas es importante (Ghasemzadeh & Namazi, 2015; Moriello, 2003).

Los interferones se encuentran involucrados en la activación y regulación de las respuestas innatas y adaptativas; permitiendo la defensa del huésped contra virus, microorganismos, y células tumorales (Landolfo et al., 1995; Mesev, LeDesma, & Ploss, 2019). El estado antiviral que generan los interferones permite combatir la replicación y propagación viral en las células infectadas, además de activar proteínas capaces de evitar el ensamblaje viral (Crosse, Monson, Beard, & Helbig, 2018; Pervolaraki et al., 2018). En consecuencia, gracias a las múltiples características que presenta esta proteína, es una alternativa para el tratamiento de enfermedades virales en perros.

La tecnología recombinante es la más utilizada para la producción de proteínas, las cuales se obtienen al clonar un gen de interés en un vector de expresión, para ser transformado en un huésped e inducir la producción proteica (Browning, Godfrey, Richards, Robinson, & Busby, 2019). La elección de un adecuado sistema de expresión es fundamental para la correcta expresión de la proteína de interés, debe poseer un alto rendimiento en el proceso de producción, dentro de lo cual se encuentran involucrados tres factores: acumulación de biomasa, duración del proceso y productividad específica (Kunert & Reinhart, 2016). Existen diferentes sistemas de expresión conocidos como son: bacterias, levaduras, baculovirus y mamíferos; cada uno con características y aplicaciones diferentes (Kuruganti, Accavitti-Loper, & Walter, 2014).

Escherichia coli es un organismo ampliamente utilizado para un sinnúmero de investigaciones, como el almacenamiento de secuencias de ADN de otros organismos, la producción de proteínas recombinantes y para probar la funcionalidad de las mismas (Science Learning Hub, 2014). La producción de interferón mediante el uso de un sistema recombinante, como *Escherichia coli*, ofrece múltiples ventajas debido a su rápido crecimiento, además no forma agregados, su genoma es conocido y su manipulación es fácil (Rosano & Ceccarelli, 2014; Vargas-Maya & Franco, 2017). Estas características además de permitir la obtención de la proteína, facilitan su purificación, permitiendo de esta manera disminuir costos y tiempos de producción (Rosano, Morales, & Ceccarelli, 2019).

Con lo mencionado anteriormente, el objetivo de este trabajo es obtener interferón alfa canino por medio del uso de un sistema recombinante en *Escherichia coli* y determinar su acción antiviral en un modelo de línea celular.

Objetivos del proyecto

Objetivo general

Obtener la molécula interferón alfa canino (IFN- α C) recombinante expresada en *Escherichia coli*, como alternativa al tratamiento de infecciones virales.

Objetivos específicos

Producir interferón alfa canino recombinante en un sistema de expresión en *Escherichia coli*.

Establecer el protocolo de purificación del interferón alfa canino recombinante expresado en *Escherichia coli*.

Evaluar la actividad antiviral del interferón alfa canino recombinante en células caninas.

Capítulo 2

Marco teórico

Interferón

Los interferones son citoquinas producidas por células eucariotas, los cuales se encuentran involucrados en la activación y regulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas (Feroze & Wang, 2018; Meyer, 2009). Representan una defensa natural de los organismos contra la invasión de agentes externos, como virus, bacterias o células tumorales (De Andrea, Ravera, Giogia, Gariglio, & Landolfo, 2002). Poseen tres funciones esenciales, la primera es su acción antiviral, la segunda su acción inmunomoduladora y su acción antiproliferativa (Hurtado-Guerrero et al., 2020; Zhang et al., 2020).

La primera línea de defensa inmunitaria ante un virus la proporcionan los interferones (Fensterl, Chattopadhyay, & Sen, 2015). Dado que los virus se replican dentro de las células huésped, una estrategia eficaz para desencadenar respuestas inmunitarias innatas es la detección de segmentos de los ácidos nucleicos virales como: ARN, genomas de ADN o ARNm; que se identifican como los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Pandey, Kawai, & Akira, 2015). Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) se unen a formas específicas de estos ácidos nucleicos tanto en el endosoma como en el citoplasma, activando la señalización para la expresión génica de interferones (Lama et al., 2019). Ante una infección viral, las células además de crear un estado antiviral secretando IFN, advierten a las células vecinas a través de esta misma molécula e inhiben la propagación viral (García, 2017).

Tipos de interferón

Los interferones se han clasificado en tres grandes grupos, IFN tipo I, II y III. Dentro de los IFN tipo I se encuentran: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , y IFN- ω . El IFN- α posee además 13

subtipos diferentes denominados IFN- α 1, - α 2, - α 4, - α 5, - α 6, - α 7, - α 8, - α 10, - α 13, - α 14, - α 16, - α 17 y - α 21. El IFN tipo II está representado por el IFN- γ y finalmente el IFN tipo III al cual pertenece los IFN- λ (Ferreira, Borba, Bonetti, Leonart, & Pontarolo, 2018).

Dentro de los IFN tipo I, los IFN- α son producidos principalmente por células dendríticas plasmocitoides y macrófagos, y los IFN- β los producen fibroblastos y células epiteliales (Valadkhan & Gunawardane, 2016). Estos generan el efecto antiviral mediante la inhibición de la replicación viral, el incremento de las células *natural killer* (NK) y la expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC I) (Keller et al., 2019). Todos los subtipos de IFN tipo I comparten el mismo complejo de receptor heterodimérico constituido por una cadena del receptor 1 de IFN- α (IFNAR1) y una cadena del receptor 2 de IFN- α (IFNAR2). La señalización de estos interferones resultan importantes en la respuesta inmune innata y adaptativa (Markey, MacDonald, & Hill, 2013), siendo los interferones tipo I las primeras citoquinas producidas durante un proceso infeccioso (A. J. Lee & Ashkar, 2018).

El IFN- γ es el único IFN tipo II, es producido principalmente por linfocitos T activados y células NK (Stanifer, Pervolaraki, & Boulant, 2019). Es una citoquina inmunomoduladora, con un complejo de receptor de IFN- γ (IFNGR), el cual consta de dos subunidades, denominadas IFNGR1 e IFNGR2 (Tang, Tian, Luo, & Yu, 2018). Su principal función viene dada por la estimulación del sistema inmunitario adaptativo, ejercen un efecto sobre las células T, macrófagos, células B, células NK, células endoteliales y células somáticas (Dimeloe et al., 2019; Z. Zhou et al., 2007). Al activar los macrófagos desencadena la expresión de altos niveles de citoquinas proinflamatorias (Green, Young, & Valencia, 2017).

Finalmente, la clase III está integrada por los IFN- λ , a estos pertenecen cuatro subtipos: λ 1, λ 2, λ 3 y λ 4 (Kotenko, Rivera, Parker, & Durbin, 2019). Posee un receptor conformado por dos subunidades: IL-28R λ (IFN λ R1) e IL-10R β (IFN λ R2) (Marín et al., 2020). Al igual que los interferones tipo I, poseen funciones importantes en las actividades inmunitarias

antivirales; la diferencia radica en que su receptor no se expresa de forma ubicua, sino que se encuentra restringido a células específicas, como las células epiteliales, melanocitos, hepatocitos y células neuronales (Lazear, Schoggins, & Diamond, 2019; J. Zhou et al., 2018).

IFN tipo I y actividad antiviral

Los interferones tipo I son secretados por casi todos los tipos de células, dentro de este grupo, los IFN- α y el IFN- β son los más importantes (García, 2017). Los IFN tipo I se caracterizan por su protección ante infecciones virales agudas; sin embargo, se conoce que pueden tener funciones protectoras ante infecciones bacterianas y enfermedades autoinmunes (Trinchieri, 2010).

Los IFN tipo I tiene una acción tanto autocrina como paracrina para desencadenar un entorno antiviral tanto en la célula infectada como en su entorno (Valadkhan & Gunawardane, 2016). Tiene una gran afinidad por su receptor IFNAR con el cual forma un trímero tras su unión, y mediante un proceso de fosforilación comienzan a activarse proteína asociada como la Janus quinasa 1 (JAK1) y tirosina quinasa 2 (TYK2), los cuales a su vez fosforilan otros factores de transcripción STAT1 y STAT2, y así desencadena toda una cascada de señalización (Figura 1) (Fensterl et al., 2015).

Los factores de transcripción son dimerizados y translocados al núcleo, donde se ensamblan con el factor regulador de IFN 9 (IRF9) para formar un complejo trimolecular llamado factor de gen estimulado por IFN 3 (ISGF3) (Bustamante et al., 2011). ISGF3 se une a sus secuencias de ADN afines conocidas como elementos de respuesta estimulada por IFN (ISRE) para activar cientos de genes antivirales como la proteína quinasa R (PKR), 2'-5' oligoadenilato sintetasa 1 y 2 (OAS1, OAS2), proteína antiviral de dedo de zinc (ZAP), viperina, entre otros (Crosse et al., 2018).

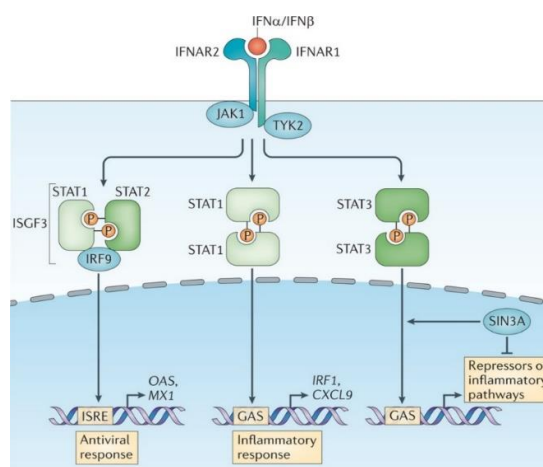
Los genes estimulados por interferón poseen diferentes funciones y mecanismos de acción, dentro de ellos tenemos genes como PKR que inhiben la síntesis de proteínas virales y la replicación del virus por medio de una fosforilación del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 subunidad 1 (eIF2 α) (Garcia et al., 2006; Vincent, Ziehr, & Moorman, 2017).

2'-5' oligoadenilato sintetasa otro gen estimulado por interferón, interactúa con la ribonucleasa L (RNaseL), degrada el ARN viral inhibiendo la replicación y disminuyendo la funcionalidad del virus (Wang et al., 2018). Las actividades antivirales de ZAP implican una unión con el ARN viral y la degradación o inhibición de traducción del virus (Kuny & Sullivan, 2016). La viperina utiliza diferentes mecanismos y dominios proteicos para unir proteínas virales, inhibiendo la entrada y replicación de virus (Chin & Cresswell, 2001).

Por lo tanto los IFN tipo I inducen distintos ISG estableciendo un estado de actividad antiviral en las células (McDonough, Lee, & Weinstein, 2017). Estas proteínas codificadas por ISG actúan mediante diversos mecanismos; tales como, la inhibición de la transcripción, traducción y replicación viral, la degradación de los ácidos nucleicos virales y la alteración del metabolismo de los lípidos celulares (MacMicking, 2012).

Figura 1

Vía de señalización del Interferón tipo I.



Nota. La figura describe la cascada de señalización de los IFN tipo I, ante la respuesta a una infección viral. Fuente: (Ivashkiv & Donlin, 2014).

Interferón alfa canino

El interferón alfa canino (IFN- α C) es producido por macrófagos, esta proteína tiene un peso aproximado de 19 kDa correspondiente a una secuencia de 164 aminoácidos (BIO-RAD, 2018). Es una glicoproteína conformada por seis residuos de cisteína, y dos sitios potenciales de N-glicosilación (Himmler, Hauptmann, Adolf, & Swetly, 1987; Taira et al., 2005). El IFN- α canino se encuentra descrito como una proteína antiviral, por lo tanto, es considerada como una posible alternativa en el tratamiento de múltiples enfermedades antivirales dentro de las que se destacan el virus del moquillo canino (CDV), la parvovirus canina, la influenza canina, entre otros (Klotz et al., 2017).

Afecciones virales caninas y sus tratamientos con IFN tipo I

El virus del distemper canino (CDV) es un virus de ARN monocatenario negativo perteneciente a la familia Paramyxoviridae que desencadena diversos síntomas entéricos y respiratorios en perros (Rendon, Da Fontoura, Wageck, & Ruiz, 2019). Afecta también al sistema nervioso central, siendo una de las repercusiones clínicas más graves para el animal, manifestándose como una leucoencefalitis (Beineke, Puff, Seehusen, & Baumgärtner, 2009). Varias investigaciones han determinado la presencia de IFN- α en el líquido cefalorraquídeo de perros infectados con CDV (Kimoto, 1986). Se ha demostrado que la activación de los interferones se da durante el inicio de la leucoencefalitis inducida por CDV, conduciendo a una expresión de varios ISG, los cuales inhiben la replicación viral principalmente en neuronas y oligodendrocitos (Giovannoni, 2018). Además la activación de la cascada de señalización de los interferones en macrófagos activados permite contribuir con los mecanismos de desmielinización en etapas avanzadas de la enfermedad (Klotz & Gerhauser, 2019).

La parvovirus canina (CPV) es una enfermedad con alta tasa de morbilidad y mortalidad en perros, es un patógeno entérico causado por este virus perteneciente a la

familia Parvoviridae con un genoma de DNA monocatenario y se conoce que está estrechamente relacionada con el parvovirus felino (Cavalli et al., 2018; P. Zhou et al., 2017). La enfermedad afecta a diferentes tejidos como los tejidos linfoides, el epitelio intestinal, la médula ósea y el corazón (Mietzsch, Pézses, & Agbandje-Mckenna, 2019) . Los principales síntomas son, vómitos, diarrea hemorrágica, depresión, pérdida de apetito, fiebre y deshidratación (Miranda & Thompson, 2016). Se ha demostrado que el uso del interferón omega felino para el tratamiento de CPV generan un efecto terapéutico significativo, disminuyendo la tasa de mortalidad así como también mejorando la sintomatología de la enfermedad (De Mari, Maynard, Eun, & Lebreux, 2003; Martin et al., 2002).

El virus de la influenza canina (CIV), pertenece al virus de la influenza A de la familia Orthomyxoviridae con genoma de ARN monocatenario de sentido negativo (Voorhees et al., 2017). Este virus resulta altamente peligroso y los perros pueden ser hospederos intermedios, antes de su transferencia a humanos (Chen et al., 2010). El virus causa diferentes patologías como leves afecciones del tracto respiratorio superior, que vienen acompañadas de fiebre, tos y una infección pulmonar. Al combinarse con otros tipos de virus pueden ocasionar una infección mixta que conduciría hacia la muerte del animal (Voorhees et al., 2017).

La teterina canina es una proteína transmembrana clave en la defensa de las células huésped que actúa inhibiendo la liberación y propagación de varios viriones (Fan et al., 2016). El gen teterina canino es regulado y expresado por la inducción de IFN- α canino debido a que contiene una secuencia de elementos respuesta a interferón, por lo que investigadores consideran la producción de IFN como una vía terapéutica para la enfermedad (Zheng et al., 2018).

Otros estudios han determinado la capacidad del IFN- α como un potente inhibidor de la inflamación gingival en perros en la cual se determinó una reducción significativa de los recuentos bacterianos periodopáticos (Ito et al., 2010). Tras realizar una administración oral de

IFN en dosis baja, se observó una reducción de la respuesta de los marcadores de estrés (Ito et al., 2010). La revisión de estos estudios, son un indicativo de las múltiples aplicaciones de los IFN tipo I en diferentes enfermedades ocasionadas en perros.

Debido a las ventajas que poseen los interferones sobre el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades tanto en humanos como en animales, el campo farmacéutico e industrial se ha visto en la obligación de desarrollar esta proteína a gran escala (M. J. Lee & Kim, 2018). La producción de proteínas puede realizarse extrayéndola de su fuente natural, pero esto implica costos altos y rendimiento bajo (Rosano & Ceccarelli, 2014). En contraste al usar sistemas de expresión recombinante, la producción proteica se da con un rendimiento elevado y económicamente es más rentable, siendo esta la mejor alternativa para la producción de biofármacos a escala industrial (Gifre, Arís, Bach, & Garcia, 2017).

Producción de proteínas recombinantes

Existen múltiples sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes dentro de los que se destacan: bacterias como *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*; levaduras como *Pichia pastoris*, y diferentes células de mamíferos que han sido utilizadas para la producción de interferones (Kuruganti et al., 2014; Lefevre, L'Haridon, Borrás-Cuesta, & la Bonnardiere, 1990). Las proteínas recombinantes se producen al clonar un gen de interés en un vector de expresión, el cual es transformado en un huésped y después de inducir la producción de la proteína esta puede ser purificada y caracterizada (Browning et al., 2019). Los limitantes para una adecuada producción proteica son principalmente la inactividad de las proteínas, el crecimiento pobre del hospedero y la formación de cuerpos de inclusión (Rosano & Ceccarelli, 2014).

***Escherichia coli* como sistema de expresión**

El sistema de expresión más utilizado para la producción de proteínas recombinantes, es el de *E. coli* el cual presenta múltiples ventajas debido a que posee un rápido crecimiento con los nutrientes y condiciones adecuadas; no forma agregados, su genoma es conocido y su manipulación es fácil (Huang, Lin, & Yang, 2012; Rosano & Ceccarelli, 2014; Vargas-Maya & Franco, 2017).

Existen diferentes cepas de *E. coli* utilizadas para la producción de proteínas recombinantes, las principales son la *E. coli* B y *E. coli* K12 (Terpe, 2006). La cepa B ofrece varias ventajas frente a la K12, como poseer una membrana externa permeable, acumulación de acetato baja, alta concentración de glucosa y deficiencias de proteasa; características que lo hacen la mejor opción para la expresión proteica (Huang et al., 2012). La cepa BL 21 se caracteriza principalmente por la ausencia de las proteasas lon y ompT, esto permite disminuir la tasa de degradación; a partir de esta cepa se deriva la cepa BL 21 (DE3) la cual contiene un profago DE3 que permite la expresión de T7 controlado por el promotor *lac* UV5 (Jeong, Kim, & Lee, 2016; Phue, Sang, Trinh, & Shiloach, 2008).

La elección adecuada de una cepa para expresar proteínas recombinantes es clave en la expresión, solubilidad y rendimiento de las proteínas (Khow & Suntrarachun, 2012). Para que el sistema de expresión sea óptimo debe incluir cepas, vectores, etiquetas moleculares (*tag*) y promotores adecuados (Jia & Jeon, 2016). Un buen vector contiene un promotor fuerte, además de etiquetas de fusión en los extremos N o C, los cuales facilitan la expresión, solubilidad y purificación de proteínas (Jia & Jeon, 2016). Las limitaciones del proceso de producción de proteínas recombinantes incluyen toxicidad, inactividad de proteínas, inestabilidad de ARNm, falta de modificación post-traducciona y formación de cuerpos de inclusión; todos estos factores deben ser controlados para una correcta obtención de la proteína de interés (Khow & Suntrarachun, 2012).

Los cuerpos de inclusión son formaciones de agregados proteicos, que se pueden acumular intracelularmente en forma de partículas refráctiles (Rinas et al., 2017). A nivel microscópico se los observa como partículas densas con una superficie lisa, de forma esférica, ovoide o cilíndrica (Singh, Upadhyay, Upadhyay, Singh, & Panda, 2015). En *E. coli* los cuerpos de inclusión generalmente se encuentran ubicados en los polos, ya sea en el citosol o en el espacio periplásmico (Arié, Miot, Sassoan, & Betton, 2006). La formación de cuerpos de inclusión ocurre cuando el nivel de expresión de la proteína supera el 2% de las proteínas celulares totales (Mitraki, Fane, Haase-Pettingell, Sturtevant, & King, 1991).

La formación de cuerpos de inclusión generan un problema en el proceso de solubilización de las proteínas; sin embargo, son varias las ventajas que se pueden obtener de ellos como la obtención de un alto nivel de expresión proteica, además facilitan la separación de las proteínas citoplasmáticas bacterianas mediante un proceso de centrifugación (Jia & Jeon, 2016; Yuan et al., 2015). Otra de las ventajas de los cuerpos de inclusión es que permiten recuperar la proteína con un alto porcentaje de rendimiento (Singh et al., 2015). Esta recuperación se lleva a cabo tras realizar una solubilización a los cuerpos de inclusión usando un agente de solubilización leve, seguidamente se realiza un replegamiento de las proteínas solubilizadas y finalmente la purificación de la proteína replegada (Singh et al., 2015).

Capítulo 3

Metodología

El presente estudio fue realizado en colaboración con la Universidad de Concepción (UdeC), con la finalidad de producir interferón alfa canino recombinante, misma que pueda ser utilizada para el tratamiento de infecciones virales en perros.

El trabajo metodológico se enfoca en tres aspectos: el primero la obtención de interferón alfa canino recombinante, seguido de la purificación del mismo y finalmente el uso de la proteína producida sobre una línea celular en un modelo *in vitro* para demostrar su actividad antiviral.

Producción de proteínas recombinantes

Para llevar a cabo el primer objetivo, se requiere la transformación de bacterias *E. coli* con el plásmido recombinante, determinar las condiciones adecuadas para su correcta expresión y su posterior producción a mayor escala.

Cepa bacteriana y plásmido

El gen codificante de IFN- α C clonado en el vector de expresión pET22 (+), y las células de *E. coli* BL21 *codon plus* no transformadas que se utilizaron para la expresión del IFN- α C recombinante fueron proporcionados por el laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Universidad de Concepción-Chile.

Transformación bacteriana por shock térmico

Con el fin de obtener bacterias *E. coli* que contengan el plásmido recombinante, se realizó la transformación de bacterias quimiocompetentes *E. coli* BL21 *codon plus* (200 μ L) con 2 μ L del plásmido pET 22b IFN- α C, y se colocó en hielo durante 30 minutos. Se incubó a 42°C

por 2 minutos, después fue colocada en hielo 10 minutos, y a continuación se los dejó durante 5 minutos a 25°C. Transcurrido este tiempo las células fueron resuspendidas en medio Luria-Bertani (LB) (Liofilchem, Italia) y se incubó por 60 minutos a 37°C. Al finalizar, las bacterias transformadas se plaquearon por extensión en placas de agar LB suplementada con 100 µg/mL de ampicilina (USBiological, EE.UU.) y se las incubó durante 16 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se selecciona a aquellas colonias transformadas positivamente, las cuales demuestran un crecimiento en el medio de cultivo, debido a su resistencia antibiótica (Novagen, 1999).

Cultivo y crecimiento en matraz.

La determinación de las mejores condiciones de cultivo, se llevaron a cabo usando medios de cultivo diferente, con el fin de determinar en cual se produce un mayor rendimiento de la proteína.

En primera instancia, se realizó un pre-inóculo con el clon transformado positivamente en 5 mL de medio de cultivo LB con 100 µg /mL de ampicilina, este fue incubado a 37 °C y 150 revoluciones por minuto (rpm) durante 16 horas. Se realizó un inóculo en un matraz con 300 mL de medio LB con ampicilina.

El cultivo fue realizado en las mismas condiciones que el pre-cultivo para lo cual se probó cuatro medios diferentes (Tabla 1), los medios Luria- Bertani (LB) y Terrific Broth (TB). Se indujo estos medios con 0,5 mM isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma) al llegar a una densidad óptica de 0,6 a 600 nm (DO_{600nm}), la cual fue medida mediante un espectrofotómetro (UV-2505, Labomed, Inc., USA). Mientras que dos medios adicionales LB y TB, fueron autoinducidos. A partir del tiempo de inducción se dejó transcurrir 6 horas y los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. Se determinó el peso húmedo de la biomasa recuperada con la ayuda de una balanza analítica.

Tabla 1*Composición de medios de cultivo líquidos.*

MEDIOS INDUCIDOS CON IPTG			
Medio Luria-Bertani (LB)		Medio Terrific Broth (TB)	
Compuesto	Concentración [g/L]	Compuesto	Concentración [g/L]
Triptona	10	Triptona	12
Extracto de levadura	5	Extracto de Levadura	24
Cloruro de sodio	10	Glicerol 85%	5,044
		Fosfato monopotásico	2,3
		Fosfato dipotásico	12,5
MEDIOS AUTOINDUCIDOS			
Medio Luria-Bertani (LB)		Medio Terrific Broth (TB)	
Compuesto	Concentración [g/L]	Compuesto	Concentración [g/L]
Triptona	10	Triptona	12
Extracto de Levadura	5	Extracto de Levadura	24
Sulfato de Amonio	3,3	Sulfato de Amonio	3,3
Fosfato monopotásico	6,8	Fosfato monopotásico	6,8
Fosfato sódico	8,9	Fosfato sódico	8,9
Glucosa	0,5	Glucosa	0,5
Lactosa	2,1	Lactosa	2,1
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,634	Sulfato de magnesio heptahidratado	0,634

Cultivo y crecimiento en fermentador.

Con el propósito de obtener un mayor volumen de crecimiento bacteriano, se realizó un escalamiento en fermentador utilizando los medios de cultivo que produjeron un mayor rendimiento de la proteína. Un pre-cultivo bacteriano del clon productor en medio LB suplementado con ampicilina fue elaborado e incubado a 37°C y 150 rpm durante 16 horas. Se realizó un cultivo en el fermentador (Winpact FS-06, EE. UU.) de un volumen de 3 Litros para lo cual se inoculó 300 mL del pre-cultivo. El cultivo se preparó en condiciones controladas a un pH= 7, 37°C y 200 rpm de agitación en medios LB y TB autoinducidos; durante 6 horas a partir de que el cultivo llega a una DO_{600nm} de 0,6. El volumen se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos, el peso húmedo se determinó en la balanza analítica.

Determinación de biomasa seca.

Para la determinación de peso seco, se tomó 1 mL de muestra de cultivo, el volumen se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de agua destilada. Se colocó en una balanza infrarroja de secado (Radwag, Radom, Poland) a 90 °C hasta peso constante; este proceso se realizó cada hora desde el tiempo cero hasta finalizado el tiempo de cultivo (E. Li & Mira De Orduña, 2010).

Ruptura de biomasa y aislamiento de cuerpos de inclusión (CI)

Para cumplir con el segundo objetivo y debido a que la proteína expresada se encuentra en forma de cuerpos de inclusión, con el fin de extraerla, se realizó la ruptura de la biomasa. A continuación, se aisló los cuerpos de inclusión y se llevó a cabo lavados y la subsecuente solubilización, para la purificación del IFN- α C.

La biomasa final obtenida se resuspendió en *buffer* de ruptura, que contiene tampón fosfato salino (PBS) y Tritón 0,1%, para obtener una suspensión de 10 gramos de peso seco/ L. La lisis celular fue llevada a cabo utilizando una prensa francesa EmulsiFlex C-5, (Avestin, Canadá), en la cual se colocó la biomasa resuspendida y se realizó nueve pases a una presión de 1000 psi. Los cuerpos de inclusión del lisado celular se sedimentaron mediante centrifugación a 5000 rpm durante 20 min. Las células obtenidas se resuspendieron en una solución de PBS en el mismo volumen utilizado para su ruptura.

Lavado de cuerpos de inclusión de IFN- α canino recombinante

El sobrenadante y el *pellet* del lisado celular se separaron por centrifugación a 5000 rpm durante 15 min, el *pellet* se lavó en una solución de NaCl 1 M + Tritón X-100 al 1%, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min. Este proceso se repitió dos veces y finalmente se realizó un lavado en PBS + Urea 2 M y de la misma forma se centrifugó a 5000 rpm durante 15

min. Por último, los cuerpos de inclusión obtenidos en la fracción insoluble se resuspendieron en PBS y se almacenaron a -4°C.

Solubilización de cuerpos de inclusión

Se utilizó como agente desnaturizante cloruro de guanidinio (3-6 M) y urea (4-8 M) en presencia y ausencia del agente reductor β -mercaptoetanol. Los lavados de los cuerpos de inclusión se realizaron a distintas temperaturas (25°C y 60°C), varios tiempos de incubación (1 h, 2 h, 4 h, 12 h), con y sin agitación (900 rpm). Las partículas insolubles se eliminaron por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos. La concentración de proteína total para todos los sobrenadantes fue medida mediante ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

Renaturalización por diálisis

La proteína desnaturizada fue dializada utilizando membranas de diálisis de 10 kDa, con PBS en ausencia y presencia de sucrosa 0,4 M. Realizamos cambios de *buffer* cada 12 horas a concentraciones de urea variantes de 4 M, 2 M, 1 M, 0 M. Para finalizar centrifugamos a 10000 rpm por 10 minutos y determinamos la presencia o no de precipitado. Obteniéndose así la proteína recombinante IFN- α C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Para identificar las proteínas producidas anteriormente, se desnaturizaron con un volumen de tampón de carga (Tris-Cl pH8 60 mM, β -mercaptoetanol 1%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,01%, glicerol 10%) y calentadas a 95 °C durante 5 minutos. A continuación, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12,5%. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 100 V en buffer de corrida Tris-base 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% p/v durante 2 horas. Los geles fueron teñidos con una solución de azul brillante de comassie G-250 por 30 minutos y desteñidos con una solución de ácido acético 10 % y metanol 20% V/V.

Electro transferencia de proteínas

La transferencia a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL Nitrocellulose (GE Healthcare, UK), se realizó una vez separadas las proteínas en SDS-PAGE, en el equipo de transferencia semi-seco Trans-Blot-Turbo (BioRad, EE. UU). El gel de poliacrilamida se colocó sobre la membrana y se le aplicó un campo eléctrico de corriente constante de 0,3 A, 25 V durante 30 minutos, en solución tampón de transferencia.

Western Blot

Para la inmuno-identificación, la membrana de nitrocelulosa electrotransferida se sumergió en leche descremada 5% con tris *buffer* salino (TBS) (solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-histidina (monoclonal 6xhis, Clontech) diluido 1:10000 en solución de bloqueo, a 4°C durante 16 horas con agitación. Se realizaron tres lavados con TBS tween 0,1 % - SDS 0,01% durante 10 minutos. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario anti-mouse 790 (Alexa fluor 790) en una dilución 1:10000 en solución de bloqueo, a 25°C en agitación durante 1 hora y se realizaron nuevamente los lavados antes descritos. La identificación de bandas inmuno-fluorescentes se realizó en el equipo Odyssey (Li-cor, EE. UU.).

Análisis de la actividad biológica del interferón

Para evaluar la actividad biológica de la proteína, se llevó a cabo dos pasos, primero un tratamiento sobre la línea celular Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) con diferentes concentraciones del IFN- α C obtenido. Seguido de la medición de la expresión de dos genes antivirales de las células mediante qPCR.

Las células MDCK se cultivaron en placas Petri con medio Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone), suplementado con 1 μ g/mL de penicilina/estreptomicina

(Hyclone), 2 mM de L-glutamina (Hyclone) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone). Se incubó a una temperatura de 37°C, con 5% de dióxido de carbono (CO₂) y 95% de oxígeno (O₂) en ambiente húmedo. En una microplaca se colocó 420000 células por pocillo (80% de confluencia), se cultivaron en medio DMEM suplementado con 1µg/mL de penicilina/estreptomicina (Hyclone), 2 mM de L-glutamina (Hyclone) y 5% de SFB. Se trataron las células con el IFN-αC obtenido, a distintas concentraciones (5 ng/µL, 10 ng/µL, 25 ng/µL, 50 ng/µL). Las células sin tratamiento se consideraron como el control.

PCR en tiempo real– análisis de genes antivirales de IFN-αC

Se extrajo el ARNm de las células con los distintos tratamientos, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Thermo Fisher Scientific, 2016). Mediante qPCR, se evaluó la producción de ARNm de los genes antivirales: proteína quinasa R (PKR) y la 2',5'-Oligoadenilato Sintetasa 2 (OAS-2), utilizando como normalizador gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La amplificación se llevó a cabo con el equipo ARIA Mx (Agilent, EE. UU.) y la cuantificación se realizó mediante el método comparativo CT, usando la fórmula $\Delta\Delta CT$ (Pfaffl, 2006). El programa de amplificación se describe en la Tabla 2.

Tabla 2

Programa de amplificación para la PCR en tiempo real.

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Transcripción reversa	50 °C	30 min	1
Activación	95 °C	10 min	1
Amplificación	90 °C	10 s	40
	60 °C	10 s	
Curva de Melting	95 °C	30 s	1
	65 °C	30 s	
	95 °C	30 s	

Capítulo 4

Resultados

El trabajo de investigación se enfocó en la producción de interferón alfa canino mediante un modelo de expresión en *Escherichia coli*, el mismo que fue realizado procurando abaratar costos y disminuir tiempos de producción. La proteína recombinante obtenida permitió su evaluación sobre la línea celular MDCK, permitiendo determinar la presencia de actividad antiviral.

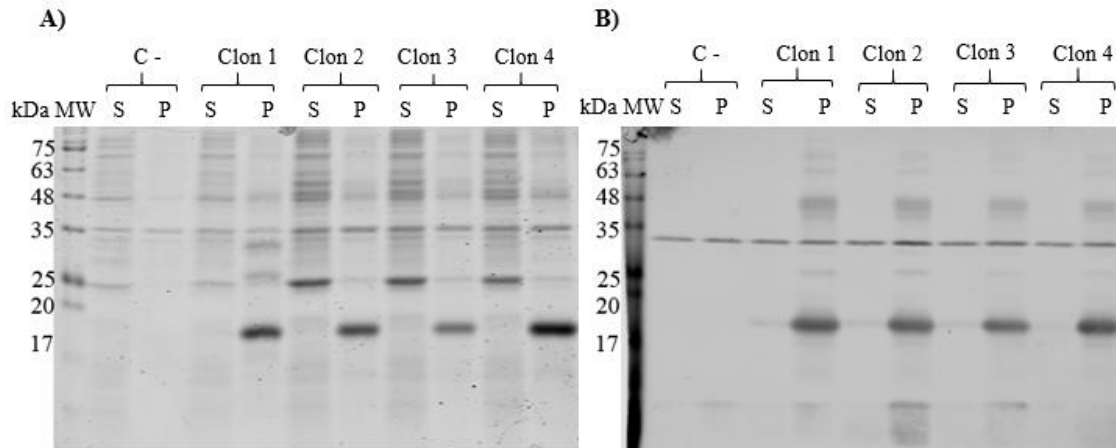
Existieron tres ejes principales para el desarrollo de este proyecto. Primero, la obtención de la proteína recombinante en *E. coli*. Segundo, la purificación y por último los análisis de expresión de genes antivirales.

Trasformación bacteriana

En primer lugar, fue necesario obtener bacterias *E. coli* que contengan el plásmido de interés. Para esto, las bacterias *E. coli* BL21 *codon plus* fueron transformados con el plásmido pET IFN- α C, cuatro clones obtenidos fueron cultivados en erlenmeyers diferentes con 100 mL de medio LB suplementado con ampicilina e inducido con IPTG 0,5 mM. Tras 5 horas de inducción se centrifugó los cultivos, se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en buffer de ruptura y homogenizado en la prensa francesa. Para evaluar el resultado se realizó un SDS-PAGE y se encontró que los cuatro clones expresan una proteína de aproximadamente 19 kDa lo cual coincide con el peso del IFN- α C (Figura 2A). Esta identificación fue confirmada por *Western Blot*, observándose la presencia de la banda de 19 kDa solo en los clones y no en el control negativo (Figura 2B). La proteína expresada fue visible en el precipitado obtenido tras la ruptura lo que nos indica que se encuentran en forma de cuerpos de inclusión (Figura 2A y 2B).

Figura 2

Identificación del clon productor de IFN- α C.



Nota. A) SDS-PAGE. B) *Western Blot*. MW: marcador de peso molecular. C+: control positivo. C: control negativo. S: sobrenadante de ruptura. P: *pellet* de ruptura.

Selección del medio de cultivo

A partir del clon productor de IFN- α C obtenido y con el fin de obtener un mayor rendimiento de la proteína, se realizó un cultivo en cuatro medios diferentes: Luria- Bertani (LB), Terrific Broth (TB) ambos inducidos con isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y los medios LB y TB autoinducidos. Los cultivos se colocaron en matraces de 300 mL, a partir de que el cultivo llegó a una densidad óptica a 600nm (DO_{600nm}) de 0,6 se indujo durante 6 horas. Se comparó la biomasa final obtenida con la intensidad de banda analizada por densitometría, los resultados exhiben que los cultivos en medios autoinducidos poseen un mejor rendimiento en comparación con los medios inducidos con IPTG (Tabla 3, Figura 3,4). Mediante SDS PAGE e inmunodetección por *Western Blot* se observó que en los cuatro casos la proteína sobre-expresada corresponde a IFN- α C.

Tabla 3

Relación intensidad de banda/ biomasa de los diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Biomasa (g)	Intensidad de banda	Relación intensidad de banda / biomasa
LB + IPTG	1,14	8440	9621,6
LB autoinducido	1,59	6940	11034,6
TB + IPTG	1,84	5020	9236,8
TB autoinducido	0,95	13900	13205

Figura 3

Relación intensidad de banda/ biomasa.

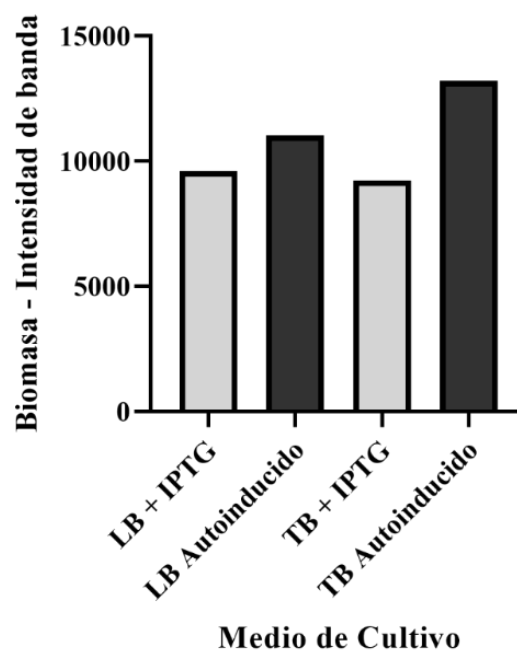
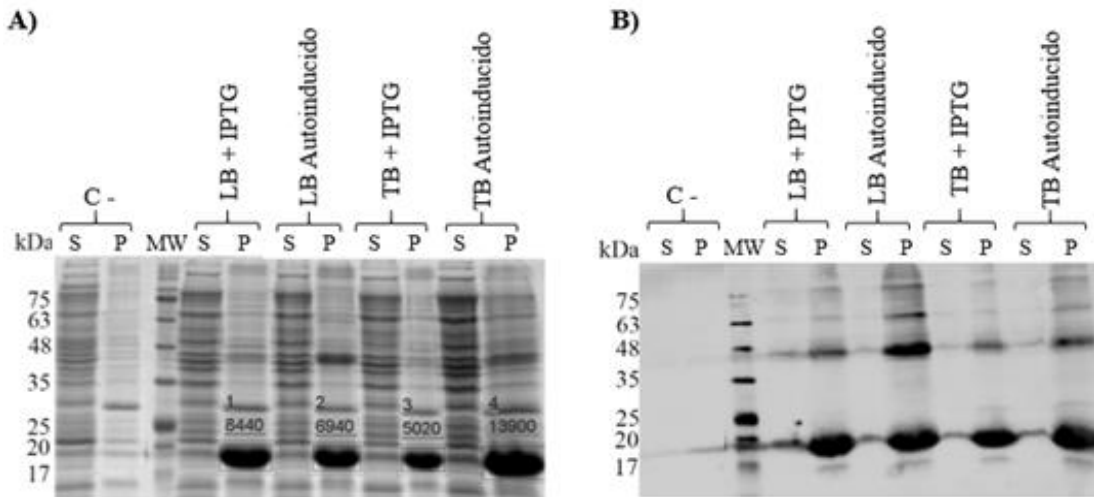


Figura 4

Selección del medio de cultivo.



Nota. A) SDS-PAGE. B) Western Blot. MW: marcador de peso molecular. C+: control positivo. C-: control negativo. S: sobrenadante de ruptura. P: *pellet* de ruptura.

Con estos resultados, se realizaron fermentaciones de 1 L con los medios de cultivo LB y TB autoinducidos, evaluándose el crecimiento celular mediante la medición de la DO_{600nm} . Se determinó que el cultivo inicia con una fase exponencial, además se calculó la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación utilizando las ecuaciones: $\mu = \frac{\ln DO_2 - \ln DO_1}{t_2 - t_1}$, $g = \frac{\ln 2}{\mu}$, respectivamente (Jacinavicius, De Carvalho, Carneiro, & Sant'Anna, 2018). Tras 6 horas de inducción, el medio LB autoinducido alcanzó un tiempo de duplicación máximo de 5,62 h; mientras que el medio TB autoinducido presentó un tiempo máximo de 6,41 h, en este mismo tiempo. Para ambos medios de cultivo la máxima velocidad de crecimiento se estableció en la primera hora de cultivo siendo esta de $0,96 \text{ h}^{-1}$ y $2,67 \text{ h}^{-1}$ para los medios LB y TB autoinducido. Dicha velocidad disminuyó con el paso de las horas llegando a una velocidad de crecimiento de $0,12 \text{ h}^{-1}$ para el medio LB autoinducido y de $0,11 \text{ h}^{-1}$ para el medio TB autoinducido (Tabla 4, Figura 5).

Tabla 4

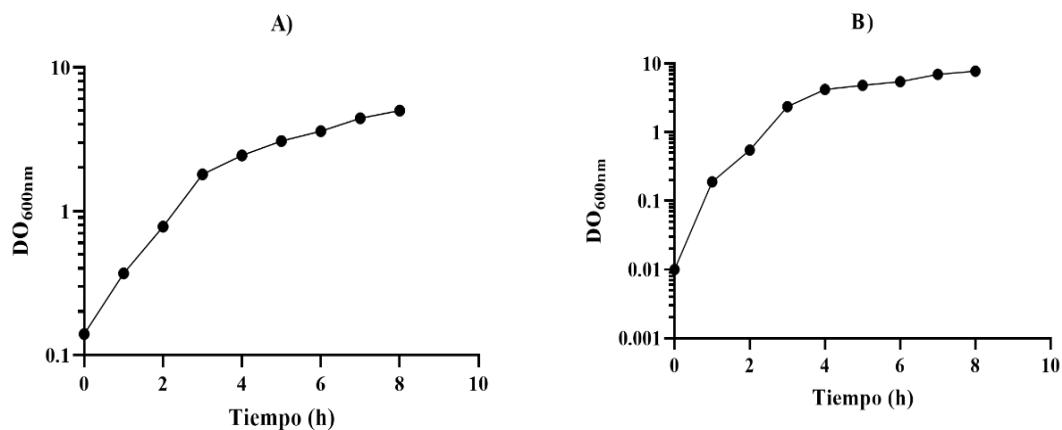
Crecimiento celular de *E. coli* BL21 transformada con el vector *pET IFN- α C* en medios de cultivo LB y TB autoinducidos.

LB autoinducida				TB autoinducido			
Tiempo(h)	DO _{600nm}	μ (h ⁻¹)	g (h)	Tiempo(h)	DO _{600nm}	μ (h ⁻¹)	g (h)
0	0,14	-	-	0	0,01	-	-
1	0,37	0,96	0,72	1	0,19	2,67	0,26
2	0,78	0,76	0,92	2	0,55	1,08	0,64
3	1,80	0,83	0,83	3	2,37	1,46	0,47
4	2,44	0,31	2,26	4	4,23	0,58	1,19
5	3,07	0,23	3,02	5	4,85	0,14	5,07
6	3,59	0,16	4,43	6	5,47	0,12	5,76
7	4,42	0,21	3,33	7	7,01	0,25	2,79
8	5,00	0,12	5,62	8	7,81	0,11	6,41

Nota. Velocidad de crecimiento (μ). Tiempo de duplicación (g).

Figura 5

Curva de crecimiento celular de *E. coli* BL21 transformada con el vector *pET IFN- α C*



Nota. Medios de cultivo: A) LB autoinducido B) TB autoinducido.

La biomasa de cada uno de los cultivos se rompió a una concentración de 10 g/L de medio de ruptura. Se realizó una comparación de intensidad de banda con la biomasa final obtenida, en donde se determinó que el medio TB autoinducido posee un mejor rendimiento

(Tabla 5, Figura 6). Considerando que la biomasa obtenida en medio LB autoinducido fue de 2,62 g, mientras que en medio TB autoinducido fue de 3,43 g.

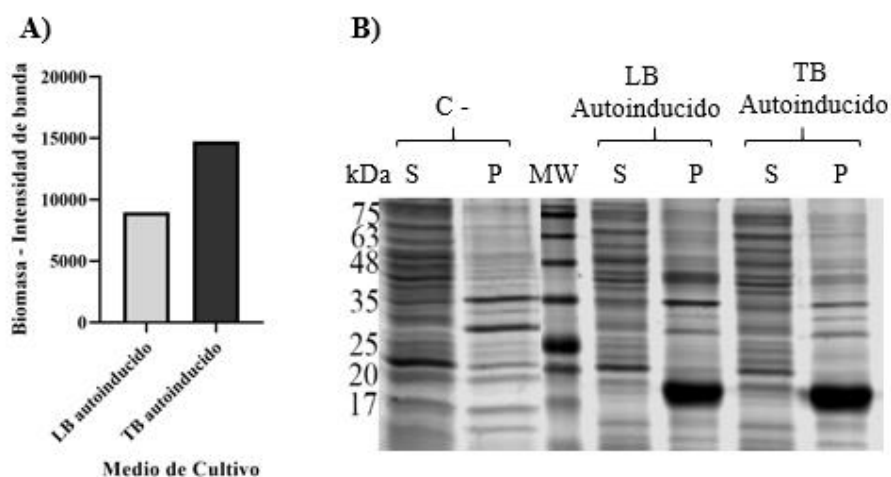
Tabla 5

Comparación del rendimiento de los medios LB y TB autoinducidos en fermentaciones de 1L.

Medio de cultivo	Biomasa (g)	Intensidad de banda	Relación biomasa x intensidad de banda
LB autoinducido	2,62	3430	8986,6
TB autoinducido	3,43	4300	14749

Figura 6

Comparación del rendimiento de los medios LN y TB autoinducidos en fermentaciones de 1L.



Nota. A) Relación intensidad de banda/ biomasa. B) SDS-PAGE. MW: marcador de peso molecular. C+: control positivo. C-: control negativo. S: sobrenadante de ruptura. P: *pellet* de ruptura.

Con estos resultados, se proseguirá trabajando con el medio TB autoinducido para los siguientes análisis.

Fermentaciones en medio de cultivo TB autoinducido

El medio TB autoinducido exhibió un mejor rendimiento por lo que se utilizó para realizar fermentaciones de 3 litros bajo condiciones controladas, proceso que se llevó a cabo por triplicado, para la evaluación de la reproductibilidad del ensayo. Se midió la $DO_{(600nm)}$ cada hora y se determinó que los cultivos alcanzan una DO_{600nm} de 0,6 en la hora 3. Se evaluó el comportamiento del crecimiento celular y se observó que los tres cultivos inician con una fase exponencial y a partir de la hora 4 la velocidad de crecimiento disminuye considerablemente. El promedio de la producción de biomasa seca fue de 2,26 g/L de cultivo, se analizó también la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación del cultivo, dándonos un promedio de $0,49\text{ h}^{-1}$ y 2,86 h; respectivamente (Tabla 6, Figura 7). Se realizó un SDS-PAGE para observar la expresión de la proteína producida, para los tres cultivos se evidenció un incremento a medida del paso de tiempo, lo que sugiere un comportamiento de producción similar en los tres casos (Figura 8).

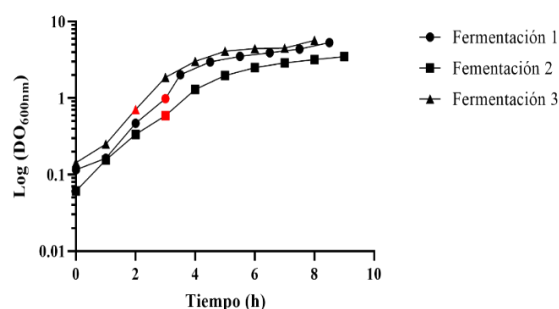
Tabla 6

Evaluación del peso seco de las fermentaciones en medio TB autoinducido

	Peso Seco (g/L)	$\mu\text{ (h}^{-1}\text{)}$	g (h)
Primera fermentación	2,22	0,51	2,90
Segunda fermentación	1,83	0,45	3,11
Tercera fermentación	2,74	0,52	2,57
Promedio	2,26	0,49	2,86

Figura 7

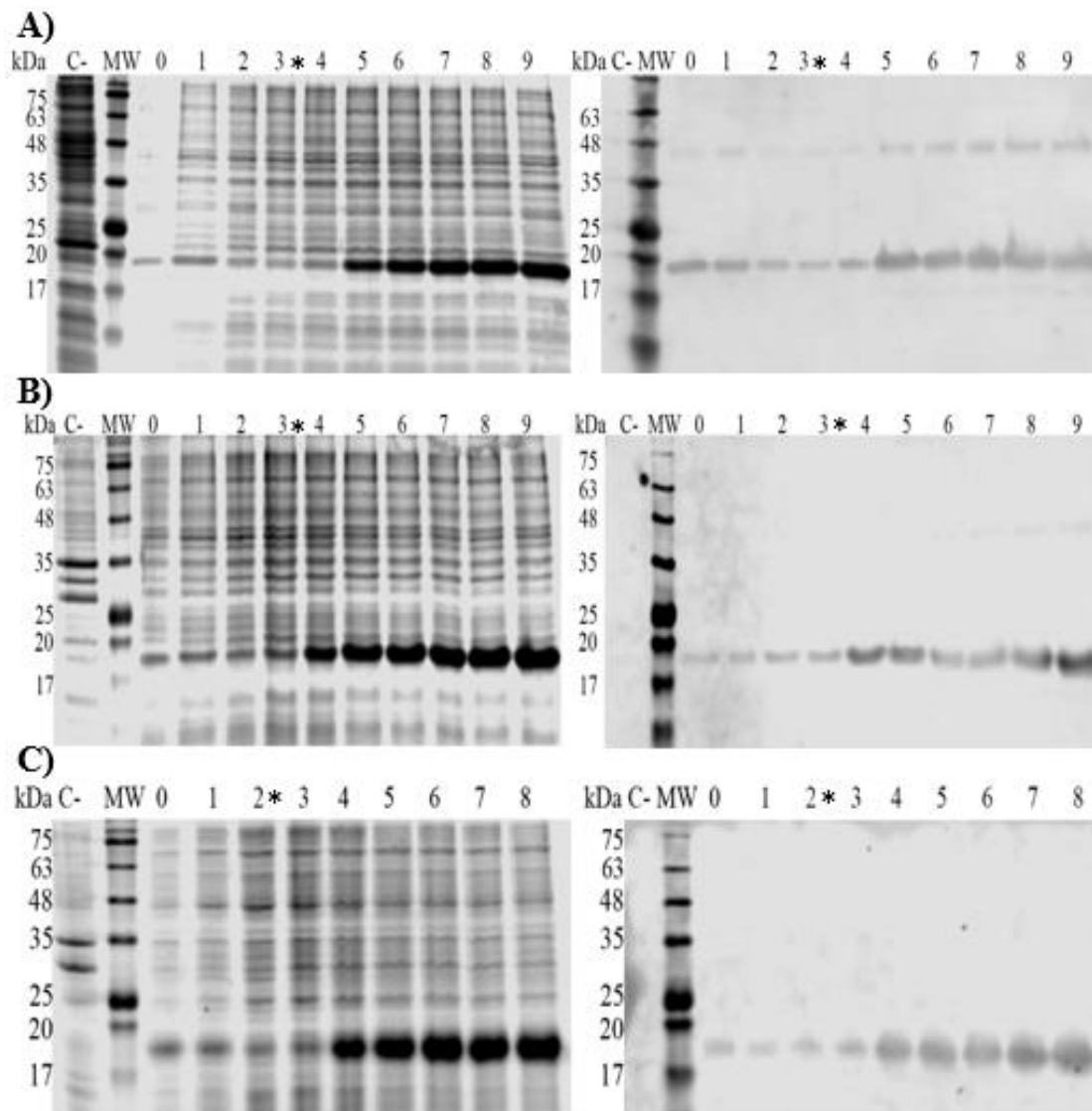
Curva de crecimiento de bacteria productora de IFN- α C en medio de cultivo TB autoinducido



Nota. Evaluación de la reproductibilidad. ●: $DO_{600nm} = 0,6$

Figura 8

SDS-PAGE de la expresión bacteriana en la producción de IFN- α C.



Nota. A) Fermentación 1. B) Fermentación 2. C) Fermentación 3. MW: marcador de peso molecular. C-: control negativo. 0-9: crecimiento de IFN- α C, cada número indica el tiempo en horas de incubación del cultivo. *: $DO_{600nm}=0,6$.

Con estos resultados, comprobamos que las bacterias *E. coli* expresan con éxito proteínas mediante la transformación con el plásmido recombinante. Además, se determinó que las proteínas expresadas se tratan efectivamente con el IFN alfa canino, debido al correcto

marcaje con los anticuerpos anti-histidina, además la talla esperada de 19 KDa fue la correspondiente

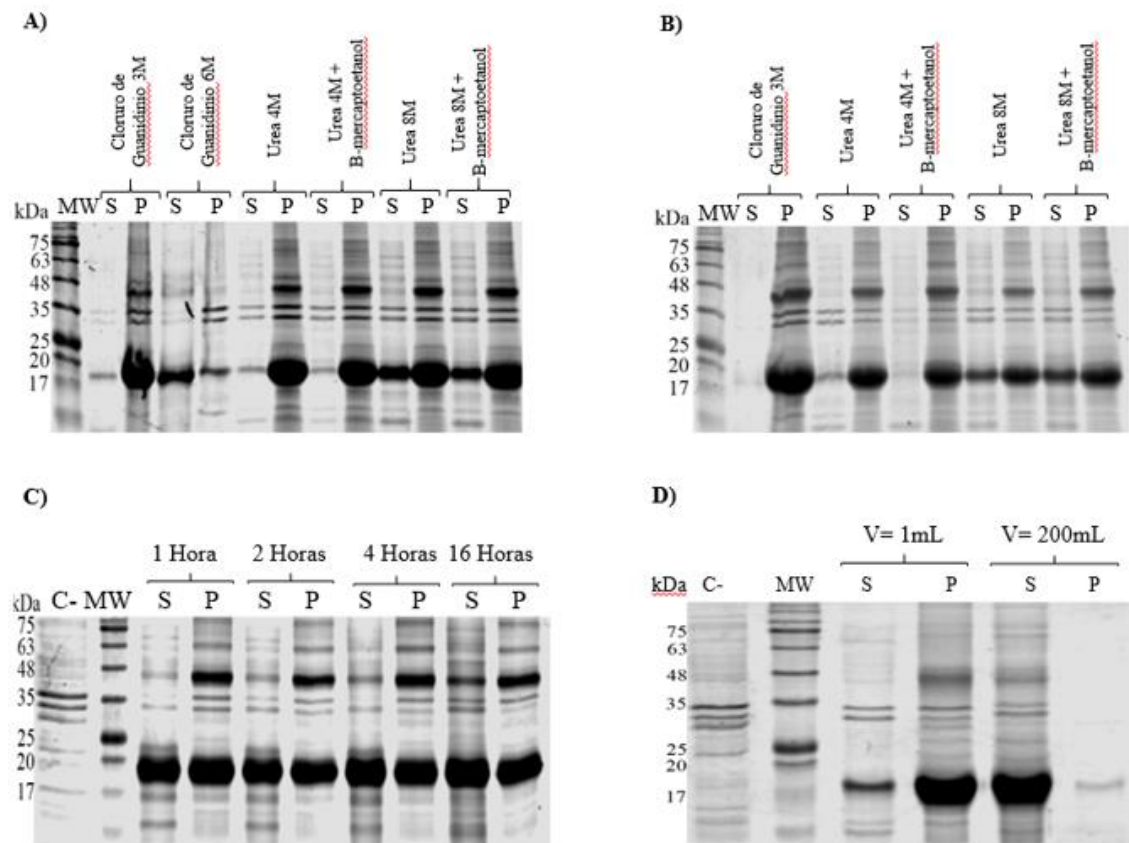
Una vez comprobado que las células *E. coli* producen la proteína recombinante IFN- α C, los resultados fueron dirigidos a la solubilización y renaturalización de la proteína.

Solubilización de cuerpos de inclusión de IFN- α C.

Se evaluó las condiciones óptimas de solubilización de los cuerpos de inclusión de IFN- α C, para lo cual se usó como agentes denaturantes, urea y cloruro de guanidinio, ambas en diferentes concentraciones. Los ensayos se realizaron utilizando tubos eppendorf en un volumen de 1 mL, se observó que la urea por sí sola no logra una buena solubilización por lo que se añadió el agente reductor β - mercaptoetanol. El cloruro de guanidinio 6M a una temperatura de 25°C, logró solubilizar los cuerpos de inclusión en mayor proporción (Figura 9A). Debido al costo elevado y alta toxicidad del cloruro de guanidinio, se realizó una prueba con una variación de temperatura, en donde se observó un mejor resultado utilizando urea a una concentración 8M complementada con 20mM de β - mercaptoetanol con una agitación de 900 rpm, durante una hora y a una temperatura de 60 °C (Figura 9B).

Para optimizar los resultados se realizó variaciones de tiempo usando urea 8M + β - mercaptoetanol 20mM en donde se observó que a las cuatro horas se dio la mayor solubilización, con tiempos posteriores no hubo cambio significativo (Figura 9C). Se llevó a cabo una solubilización en un vaso de precipitación con un volumen de 200 mL utilizando urea 8M + β - mercaptoetanol 20mM a 60°C se lo sometió a agitación durante 4 horas. Las mismas condiciones se evaluaron en un ensayo usando un volumen menor de 1mL en un tubo eppendorf, en donde se determinó una mejor solubilización con el mayor volumen utilizado (Figura 9D).

Figura 9

Solubilización de los cuerpos de inclusión de IFN- α C

Nota. A) Solubilización a 25°C durante 1 hora. B) Solubilización a 60°C durante 1 hora. C) Solubilización con urea 8M+ β -mercaptoetanol a 60°C durante 1, 2, 4 y 16 horas. D) Solubilización con urea 8M+ β -mercaptoetanol a 60°C durante 4 horas en volumen de 1 y 20 mL. MW: marcador de peso molecular. C-: control negativo. S: sobrenadante. P: *pellet*.

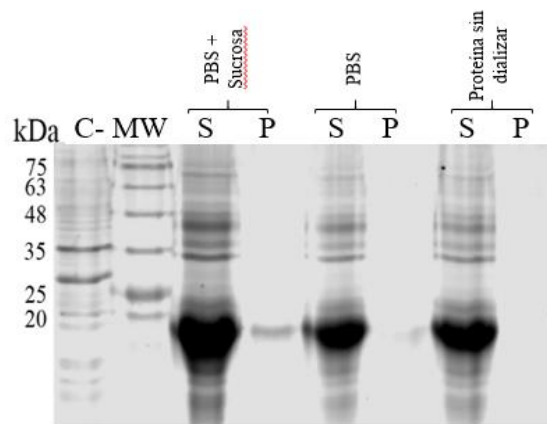
Renaturalización de IFN- α C.

La renaturalización proteica se llevó a cabo mediante diálisis utilizando dos condiciones diferentes, la primera solo en presencia de PBS y la segunda con PBS complementada con sucrosa 0,4M (Figura 10). Mediante una curva de BSA y utilizando el método de ácido bicinónico (BCA), se realizó una cuantificación proteica donde se

determinó que el uso de PBS con sucrosa 0,4 M concentró de mejor manera la proteína obteniéndose una concentración final de 3,85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. En contraste, con el uso de PBS solo se obtuvo una concentración de 0,85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína. Adicionalmente, se evaluó el porcentaje de pureza y rendimiento en donde se obtuvo 82,66% y 0,56 g/L de cultivo; respectivamente usando PBS más sucrosa (Figura 11. Tabla 7).

Figura 10

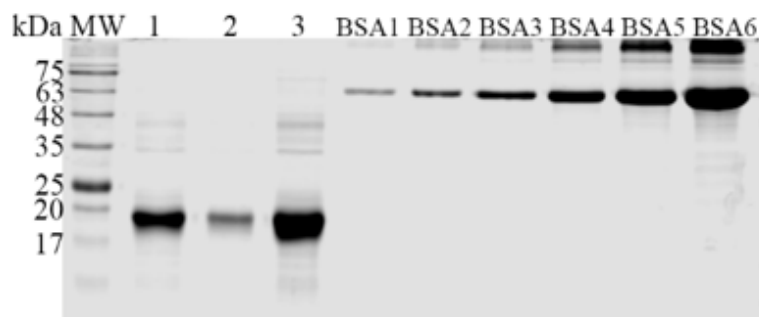
Renaturalización de la proteína IFN- α C.



Nota. MW: marcador de peso molecular. C-: control negativo. S: sobrenadante. P: *pellet*.

Figura 11

Cuantificación de IFN- α C mediante curva de BSA



Nota. MW: marcador de peso molecular. 1: Proteína sin dializar. 2: Proteína dializada en PBS.

3: Proteína dializada en PBS con Sucrosa. BSA1: 62,5 $\text{ng}/\mu\text{L}$. BSA2: 125 $\text{ng}/\mu\text{L}$. BSA3: 250 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

BSA4: 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$. BSA5: 1000 $\text{ng}/\mu\text{L}$. BSA6: 2000 $\text{ng}/\mu\text{L}$

Tabla 7

Cuantificación del proceso de renaturalización de IFN- α C, cálculo de pureza y porcentaje de rendimiento.

Muestra	Cuantificación por BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Cuantificación por BCA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Pureza (%)	Rendimiento (g/ L de cultivo)
Sin dializar	2,56	2,61	83,84	0,57
PBS	0,71	0,85	84,32	0,21
PBS + Sucrosa	4,11	3,85	82,66	0,56

Una vez concluidos los ensayos de cuantificación y al analizar tanto la pureza como el rendimiento de la proteína obtenida, los análisis se centraron en la evaluación de la actividad biológica de IFN- α C sobre la línea celular MDCK.

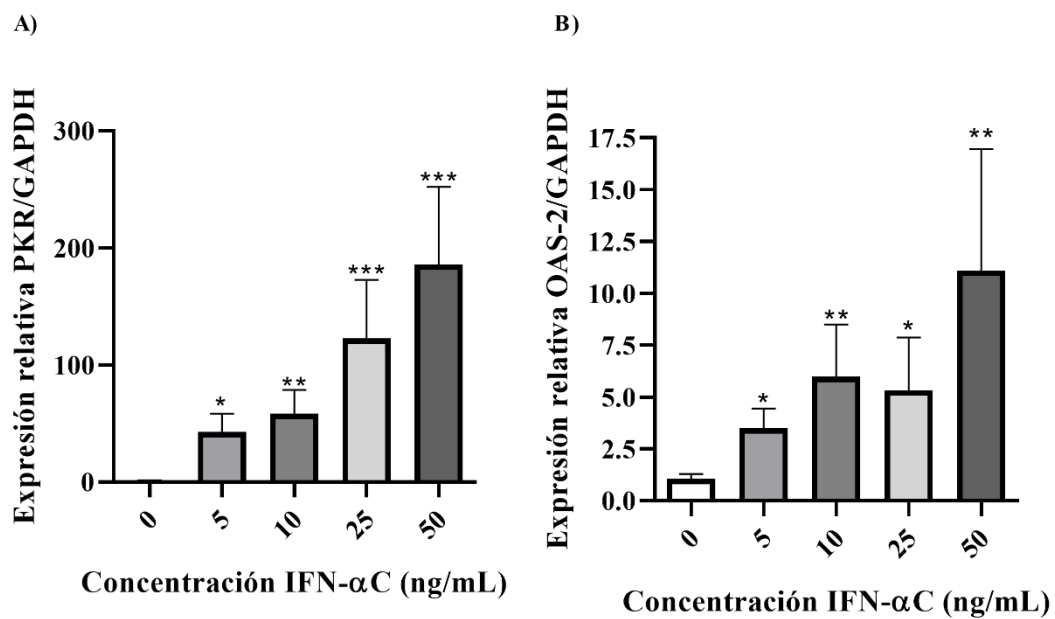
Análisis de la actividad biológica de IFN- α C por qPCR

El análisis de la actividad biológica fue realizado en dos fases. Primero un tratamiento sobre la línea celular MDCK con el IFN- α C obtenido, seguido de la cuantificación de la expresión génica de marcadores antivirales. La evaluación de marcadores antivirales fue realizada en células MDCK con una confluencia del 70%, estas fueron estimuladas con concentraciones diferentes de IFN- α C durante 24 horas.

La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando reactivo TRIzol. Mediante reacciones de PCR y utilizando el kit de un paso Brilliant II, se evaluó el aumento de la actividad antiviral de la proteína kinasa R (PKR) y la 2',5'-Oligoadenilato Sintetasa 2 (OAS-2). Los resultados exhiben un aumento de estos marcadores a la concentración de 50 ng/mL siendo estadísticamente significativo ($* < p 0,05$) para ambos genes (Figura 12).

Figura 12

Análisis de la expresión del ARNm de genes antivirales.



Nota. A) Análisis del efecto del IFN- α C en la expresión de ARNm para PKR. B) Análisis del efecto del IFN- α C en la expresión de ARNm para OAS-2.

Capítulo 5

Discusión

La actividad antiviral y su acción dentro de las respuestas inmunes innatas y adaptativas de los interferones, han permitido que estos sean una alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por virus o bacterias (Feroze & Wang, 2018). El uso de interferones recombinantes, se incluye actualmente en los tratamientos de diferentes tipos de enfermedades ya sean de origen viral o no (Fensterl & Sen, 2009; Teijaro, 2016).

La producción de proteínas recombinantes puede ser llevada a cabo en diferentes sistemas de expresión siendo uno de los más usados el de *Escherichia coli*, debido a sus bajos costos y alta tasa de replicación (Khow & Suntrarachun, 2012; Vargas-Maya & Franco, 2017). La elección de la cepa depende del tipo de vector y la proteína de interés. Para nuestro estudio se utilizó la cepa *E. coli* BL21 *codon plus*, que posee múltiples genes de ARNt, el cual permite un alto nivel de expresión de muchos genes recombinantes heterólogos (Agilent Technologies, 2015), haciendo efectiva la producción de proteínas recombinantes (Akiba & Tsumoto, 2016).

Los clones transformados, mostraron que el interferón alfa canino (IFN- α C) contenido dentro de las bacterias, se encuentra en su gran mayoría formando parte de la fracción insoluble (Figura 2). Es decir, se expresa en forma de agregados proteicos conocidos como cuerpos de inclusión (CI) (Ehgartner et al., 2017).

Estudios demuestran que la formación de cuerpos de inclusión ocurre cuando el nivel de expresión de la proteína supera el 2% de las proteínas celulares totales, generando una acumulación intracelular que conducen a la formación de estos agregados (Mitraki et al., 1991; Singh et al., 2015). Según Rinas y colaboradores (2017), el alto nivel de expresión proteica evidenciada, se debe a la formación de los CI, debido a la acumulación progresiva de los nuevos polipéptidos recombinantes producidos.

El establecimiento de un medio de cultivo adecuado para llevar a cabo el crecimiento bacteriano es un proceso importante dentro de la producción de proteínas recombinantes (Rosano & Ceccarelli, 2014). Los cultivos realizados en matraz utilizando cuatro medios de cultivo diferentes, demostraron que los medios de cultivo autoinducidos poseen un mejor rendimiento en comparación con aquellos que fueron inducidos con IPTG (Figura 3).

El sistema bacteriano utilizado posee un promotor *lac*, que generalmente es inducido por IPTG (Long et al., 2015), en este trabajo se probó medios autoinducidos como alternativa para evitar el uso de IPTG, los medios de cultivo autoinducidos utilizan como fuente de carbono inicial la glucosa, y una vez que esta es consumida por completo, la lactosa actúa como inductor proporcionándole la fuente de carbono necesaria (Long et al., 2015; Studier, 2005). Además, la adición de los diferentes oligoelementos proporciona al medio los nutrientes necesarios para que la bacteria crezca hasta alcanzar un estado de saturación, sin necesidad de añadir ningún tipo de componente adicional (Blommel, Becker, Duvnjak, & Fox, 2008).

Una investigación realizada por Fathi-Roudsari y colaboradores en 2018, demuestra como la composición del medio de cultivo influye en el rendimiento de la producción de la proteína de interés. Al comparar la adición de diferentes oligoelementos sobre medio de cultivo LB, los mejores resultados se presentan con concentraciones iguales a las utilizadas en la elaboración del presente trabajo. Studier (2005), menciona que la autoinducción en comparación con la inducción con IPTG; es más conveniente, eficiente y económica para producir proteínas en pequeña escala e incluso a escala comercial. Se ha reportado además que el IPTG es tóxico para la célula lo que resulta una desventaja para el proceso productivo (Ramchuran, Holst, & Karlsson, 2005).

Se realizaron cultivos en fermentadores utilizando los dos medios autoinducidos, los resultados indicaron que el mejor medio para la producción de IFN- α C es el medio TB

autoinducido (Figura 6), el cual exhibió una mejor expresión proteica y una mayor biomasa final. Este resultado se explica debido a que el medio TB autoinducido, en comparación con el medio LB autoinducido posee mayor concentración de extracto de levadura y triptona (Tabla 1).

Mosser y colaboradores (2013) mencionan que uno de los factores influyentes para garantizar una óptima producción de proteínas, es el correcto suministro de energía; por lo que el extracto de levadura además de ayudar a la glucosilación proteica, es la principal fuente energética, gracias al aporte de nucleótidos y nucleósidos (Hu et al., 2018). La triptona es la encargada de aportar los aminoácidos necesarios para el correcto crecimiento bacteriano; según King y otros (2018), una buena proporción de aminoácidos mejora la tasa de crecimiento de las bacterias. Un estudio realizado por Pham y colaboradores en el 2005, determina que el uso de triptona aumenta la productividad en la síntesis de proteínas recombinantes.

Con el medio de cultivo seleccionado, TB autoinducido, se realizó una producción utilizando un volumen de tres litros, las fermentaciones se realizaron por triplicado y en las mismas condiciones, en la cual se obtuvo cinéticas de crecimientos similares lo que garantiza la reproducibilidad del ensayo (Figura 7,8). Además, el peso seco promedio obtenido de 2,26 g/L, exhibe un buen rendimiento en la producción de IFN- α C (Tabla 6).

Los cuerpos de inclusión son agregados proteicos insolubles, por lo que el paso previo a la renaturalización de la proteína es su solubilización (Singhvi, Saneja, Srichandan, & Panda, 2020). La solubilización de los CI se realizó con agentes denaturantes, urea y cloruro de guanidinio; con una concentración 6M de cloruro de guanidinio y urea 8M combinada con β -mercaptoetanol, se logró solubilizar los CI (Figura 9). El cloruro de guanidinio tiene un efecto denaturante mayor que el de la urea y es por eso que necesita una menor concentración para la solubilización de los CI (Tsumoto, Ejima, Kumagai, & Arakawa, 2003). Sin embargo, se ha

reportado que el cloruro de guanidinio produce una agregación considerable de la proteína que como resultado genera una baja recuperación de la proteína bioactiva, esto adicionado con el costo asociado que implica su uso (Upadhyay, Singh, Jha, Singh, & Panda, 2016), son consideraciones que hicieron cuestionables el uso del mismo.

Singhvi y otros (2020), establecen varios métodos de solubilización alternativos que podrían utilizarse con lo que se podrían mejorar los resultados. Sin embargo, el objetivo es la minimización de los costos de producción, por lo que la mejor opción para la solubilización de IFN- α C, es el uso de urea como agente denaturante acompañado del agente reductor β -mercaptoetanol.

Un estudio realizado por Datta y colaboradores en el 2013, determinó que se puede lograr una solubilización de cuerpo de inclusión al someterlos a calor mediante el uso de microondas, lo que permite disminuir considerablemente el tiempo del proceso. Para mejorar la solubilización de IFN- α C en urea y β -mercaptoetanol, adicionamos el factor temperatura acompañado con agitación, en donde se logró una mejor solubilización de la proteína cuando el ensayo fue realizado en un matraz, contrario a lo que se evidenció al realizarlo en un tubo eppendorf. Esto se debe a que la agitación en matraz se llevó a cabo de manera más efectiva, por lo que el aumento de la superficie de contacto de los CI con el agente denaturante se vio favorecido, mejorando la solubilización de los cuerpos de inclusión en un tiempo de cuatro horas (Figura 9D).

Para que una proteína presente actividad biológica esta debe ser replegada (He & Ohnishi, 2017), dado que la solubilización de la proteína se realizó a partir de una combinación de un agente reductor y una alta concentración de agente denaturante, la renaturalización se logra mediante la eliminación del exceso de estos agentes a partir de una dilución o un intercambio iónico, por lo que la diálisis es un proceso efectivo para llevar a cabo este replegamiento (Clark, 2001).

La diálisis de la proteína utilizando PBS con o sin sucrosa, mostró diferencias en los rendimientos finales. La utilización de PBS en presencia de sucrosa permitió concentrar a la proteína en un 32%, lo contrario a lo que sucedió al usar únicamente PBS en donde se mostró una pérdida del 70% de la proteína al compararla con la molécula sin dializar (Figura 11). Este resultado indica que el uso de un agente estabilizador como la sucrosa es necesario para evitar la pérdida de la molécula de interés en el proceso de renaturalización (Tsumoto et al., 2003).

Tras la renaturalización se obtuvo una pureza de la proteína del 82,66% (Tabla 7), evitando el uso de un paso adicional como la realización de una purificación por cromatografía, la obtención de este alto porcentaje de pureza se explica por la formación de agregados de la proteína como cuerpos de inclusión (Ramón, Señorale-Pose, & Marín, 2014; Singhvi et al., 2020).

Los ensayos sobre las células MDCK mostraron que al ser estimuladas con IFN- α C, se produce un aumento del ARN mensajero para los genes PKR y OAS2. La estadística para ambos genes fue más significativa con una concentración de 50 ng/mL de IFN- α C, indicando que esta es la mejor concentración para activar los genes relacionados a la respuesta antiviral.

Los resultados obtenidos demuestran que efectivamente el IFN- α C producido posee una actividad biológica sobre genes antivirales. Un estudio realizado por Taira y otros (2005), determinó la existencia de actividad antiviral de IFN- α C mediante un ensayo de inhibición del efecto citopático utilizando virus de New Jersey en células MDCK. Sin embargo, es necesario confirmar el efecto protector del IFN- α C producido, mediante la realización de ensayos de protección viral.

Capítulo 6

Conclusiones

- Expresamos IFN- α C como cuerpos de inclusión, en *Escherichia coli* BL-21 *codon plus*, utilizando el medio de cultivo TB autoinducido, con una concentración de biomasa final de 2,26 g/L de cultivo.
- El uso del medio TB autoinducido permitió disminuir tiempo y costos de producción.
- Los cuerpos de inclusión de IFN- α C obtenidos presentaron un porcentaje de pureza del 83,84%, por lo que no se realizó un proceso de purificación adicional.
- El mayor rendimiento de IFN- α C renaturalizado por litro de cultivo, se logró solubilizando los cuerpos de inclusión utilizando urea 8M y β -mercaptoetanol.
- El replegamiento de IFN- α C se realizó mediante diálisis en PBS, al usar sucrosa como estabilizador se logró concentrar mejor la proteína.
- El IFN- α C producido induce un aumento del ARNm en los marcadores antivirales PKR y OAS-2 en la línea celular MDCK, demostrando su actividad.

Recomendaciones

- Realizar réplicas del ensayo de selección de medio de cultivo para confirmar que el medio de cultivo TB autoinducido es el más eficiente para la producción de IFN- α C.
- Realizar pruebas de solubilización y renaturalización adicionales, utilizando otros protocolos y reactivos, de tal manera que se pueda abaratar los costos de producción y el escalamiento del proceso.
- Es importante realizar la validación del efecto protector de IFN- α C, mediante ensayos de protección viral, que permitan confirmar la acción antiviral de nuestra proteína obtenida.

Capítulo 7

Bibliografía

- Agilent Technologies. (2015). *BL21-CodonPlus Competent Cells Instruction Manual LIMITED PRODUCT WARRANTY ORDERING INFORMATION AND TECHNICAL SERVICES Email*. Retrieved from www.genomics.agilent.com
- Akiba, H., & Tsumoto, K. (2016). *Expression in Bacteria and Refolding*. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56030-2_1
- Aldaz, J. (2014). *Cepas de PVC-2 y su relación con el cuadro clínico de la parvovirus canina en la Provincia de Bolívar, Ecuador*. Universidad Central “Marta Abreu” De Las Villas, Santa Clara.
- Aldaz, J., García, J., & Quiñones, R. (2012). Parvovirus canina en la provincia Bolívar, Ecuador. Utilidad de los modelos Box-Jenkins para su análisis y predicción. *Revista de Salud Animal, 34*(3), 165–172.
- Aldaz, J., García, J., & Quiñonez, R. (2015). Factores de riesgo asociados a la Parvovirus Canina en el Cantón Guaranda, Bolívar, Ecuador. *Revista de Salud Animal, 37*(3). Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2015000300006
- Arié, J.-P., Miot, M., Sassoon, N., & Betton, J.-M. (2006). Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology, 62*(2), 427–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05394.x>
- Ashnagar, F., Khodabandeh, M., Arpanaei, A., Sadigh, Z. A., Rahimi, F., & Shariati, P. (2014). Optimizing primary recovery and refolding of human interferon- β from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Iranian Journal of Biotechnology, 12*(4), 26–34. <https://doi.org/10.15171/ijb.1157>
- Asim, M., Rashid, A., Majeed, A., Wahid, M., Razak, S., & Jamil, A. (2017). Association of Interferon Alpha Receptor 1 with sustained virological response in hepatitis C and B co-infected patients. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association, 67*(7), 980–985. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28770872>
- Babiuk, L. A., Lawman, M. J. P., & Gifford, G. A. (1987). Use of recombinant bovine alpha1

interferon in reducing respiratory disease induced by bovine herpesvirus type 1.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 31(5), 752–757.

<https://doi.org/10.1128/AAC.31.5.752>

Barros, Á. (2015). *Determinación de la incidencia de Distemper canino por el método de test rápido CDV en el cantón Naranjal*. (Universidad Católica de Santiago de Guayaquil).

Retrieved from <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/4524/1/T-UCSG-PRE-TEC-CMV-5.pdf>

Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F., & Baumgärtner, W. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2008.09.023>

BIO-RAD. (2018). Recombinant Dog IFN Alpha | Bio-Rad. Retrieved July 1, 2019, from <https://www.bio-rad-antibodies.com/protein/dog-canine-ifn-alpha-recombinant-protein-pdp009.html?f=rec.protein>

Blommel, P. G., Becker, K. J., Duvnjak, P., & Fox, B. G. (2008). Enhanced Bacterial Protein Expression During Auto-Induction Obtained by Alteration of Lac Repressor Dosage and Medium Composition. *Biotechnology Progress*, 23(3), 585–598.

<https://doi.org/10.1021/bp070011x>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Browning, D. F., Godfrey, R. E., Richards, K. L., Robinson, C., & Busby, S. J. W. (2019, April 30). Exploitation of the Escherichia coli lac operon promoter for controlled recombinant protein production. *Biochemical Society Transactions*, Vol. 47, pp. 755–763.

<https://doi.org/10.1042/BST20190059>

Bustamante, M. F., Fissolo, N., Río, J., Espejo, C., Costa, C., Mansilla, M. J., ... Comabella, M. (2011). Implication of the toll-like receptor 4 pathway in the response to interferon- β in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 70(4), 634–645.

<https://doi.org/10.1002/ana.22511>

Cavalli, A., Marinaro, M., Desario, C., Corrente, M., Camero, M., & Buonavoglia, C. (2018). In vitro virucidal activity of sodium hypochlorite against canine parvovirus type 2.

Epidemiology and Infection, 146(15), 2010–2013.

<https://doi.org/10.1017/S0950268818002431>

Céspedes, P. F., Cruz, P., & Navarro, C. O. (2010). Modulación de la respuesta inmune durante la infección por virus distemper canino: implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas. In *Arch Med Vet* (Vol. 42). Santiago, Chile.

Chen, Y., Zhong, G., Wang, G., Deng, G., Li, Y., Shi, J., ... Chen, H. (2010). Dogs are highly susceptible to H5N1 avian influenza virus. *Virology*, 405(1), 15–19.

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.024>

Chin, K. C., & Cresswell, P. (2001). Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15125–15130.

<https://doi.org/10.1073/pnas.011593298>

Clark, E. D. B. (2001, April 1). Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 12, pp. 202–207. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00200-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00200-7)

Crosse, K. M., Monson, E. A., Beard, M. R., & Helbig, K. J. (2018, March 1). Interferon-Stimulated Genes as Enhancers of Antiviral Innate Immune Signaling. *Journal of Innate Immunity*, Vol. 10, pp. 85–93. <https://doi.org/10.1159/000484258>

Datta, I., Gautam, S., & Gupta, M. N. (2013). Microwave assisted solubilization of inclusion bodies. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.1186/2043-7129-1-2>

Day, M. J. (2016). Pet-Related Infections. *American Family Physician*, 94(10), 794–802.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27929279>

De Andrea, M., Ravera, R., Giogia, D., Gariglio, M., & Landolfo, S. (2002). The Interferon System: an overview. *European Journal of Paediatric Neurology*, 6, A41–A46. Retrieved from https://www.academia.edu/13390825/The_interferon_system_an_overview

De Mari, K., Maynard, L., Eun, H. M., & Lebreux, B. (2003). Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *The Veterinary Record*, 152(4), 105–108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12572939>

Dimeloe, S., Gubser, P., Loeliger, J., Frick, C., Develioglu, L., Fischer, M., ... Hess, C. (2019).

Tumor-derived TGF- β inhibits mitochondrial respiration to suppress IFN- γ production by

- human CD4+ T cells. *Science Signaling*, *12*(599).
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aav3334>
- Dixon, S., Walters, S. J., Turner, L., & Hancock, B. W. (2006). Quality of life and cost-effectiveness of interferon-alpha in malignant melanoma: results from randomised trial. *British Journal of Cancer*, *94*(4), 492–498. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602973>
- Duque, J., Forero, N. R., Díaz, F. J., Martins, E., Barato, P., & Ruiz, J. (2019). Phylogenetic evidence of the intercontinental circulation of a Canine distemper virus lineage in the Americas. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52345-9>
- Duque, Y., Echeverri, M., Trejos, J., & Ruiz, J. (2017). Prevalence and molecular epidemiology of Canine parvovirus 2 in diarrheic dogs in Colombia, South America: A possible new CPV-2a is emerging? *Veterinary Microbiology*, *201*, 56–61.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.039>
- Ehgartner, D., Sagmeister, P., Langemann, T., Meitz, A., Lubitz, W., & Herwig, C. (2017). A novel method to recover inclusion body protein from recombinant E. coli fed-batch processes based on phage ΦX174-derived lysis protein E. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(14), 5603–5614. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8281-x>
- Fan, L., Liu, L., Zhu, C., Zhu, Q., Lu, S., & Liu, P. (2016). MT1-MMP inhibits the activity of Bst-2 via their cytoplasmic domains dependent interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060818>
- Fathi-Roudsari, M., Maghsoudi, N., Maghsoudi, A., Niazi, S., & Soleiman, M. (2018). Auto-induction for high level production of biologically active reteplase in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, *151*, 18–22.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.05.008>
- Fensterl, V., Chattopadhyay, S., & Sen, G. C. (2015, November 9). No Love Lost between Viruses and Interferons. *Annual Review of Virology*, Vol. 2, pp. 549–572.
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055249>
- Fensterl, V., & Sen, G. C. (2009). Interferons and viral infections. *BioFactors*, *35*(1), 14–20.
<https://doi.org/10.1002/biof.6>
- Feroze, K. B., & Wang, J. (2018). Interferon Induced Retinopathy. In *StatPearls*. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722892>

- Ferreira, V., Borba, H., Bonetti, A., Leonart, L., & Pontarolo, R. (2018). Cytokines and Interferons: Types and Functions. In *Autoantibodies and Cytokines*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.74550>
- Fleming, J. M., Creevy, K. E., & Promislow, D. E. L. (2011). Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related Causes of Death. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), 187–198. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0695.x>
- Gamble, L., Gibson, A. D., Shervell, K., Lohr, F., Otter, I., & Mellanby, R. J. (2018). The problem of stray dogs. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 37(2), 543–550. <https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2822>
- García, A. (2017, August 9). Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. *Cell Host and Microbe*, Vol. 22, pp. 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.012>
- Garcia, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., & Esteban, M. (2006). Impact of Protein Kinase PKR in Cell Biology: from Antiviral to Antiproliferative Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 1032–1060.
<https://doi.org/10.1128/mubr.00027-06>
- Gershwin, L. J. (2018, March 1). Adverse Reactions to Vaccination: From Anaphylaxis to Autoimmunity. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, Vol. 48, pp. 279–290. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.005>
- Ghasemzadeh, I., & Namazi, S. H. (2015). Review of bacterial and viral zoonotic infections transmitted by dogs. *Journal of Medicine and Life*, 8(Spec Iss 4), 1–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28316698>
- Gifre, L., Arís, A., Bach, À., & Garcia, E. (2017, March 4). Trends in recombinant protein use in animal production. *Microbial Cell Factories*, Vol. 16, p. 40.
<https://doi.org/10.1186/s12934-017-0654-4>
- Giovannoni, F. (2018). *Rol antiviral intrínseco de PML en la infección con flavivirus*. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Gómez, J. (2018). La importancia de los perros en la sociedad | Revista Almiar. Retrieved June

- 17, 2019, from Revista Almiar website: <https://margencero.es/margencero/perros/>
- Green, D. S., Young, H. A., & Valencia, J. C. (2017, August 25). Current prospects of type II interferon γ signaling & autoimmunity. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 292, pp. 13925–13933. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.774745>
- Hasselbalch, H. C., & Holmström, M. O. (2019, January 11). Perspectives on interferon-alpha in the treatment of polycythemia vera and related myeloproliferative neoplasms: minimal residual disease and cure? *Seminars in Immunopathology*, Vol. 41, pp. 5–19. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0700-2>
- He, C., & Ohnishi, K. (2017). Efficient renaturation of inclusion body proteins denatured by SDS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(4), 1250–1253. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.003>
- Himmler, A., Hauptmann, R., Adolf, G., & Swetly, P. (1987). Structure and Expression in *Escherichia coli* of Canine Interferon- α Genes. *Journal of Interferon Research*, 7(2), 173–183. <https://doi.org/10.1089/jir.1987.7.173>
- Hu, D., Zhao, L., Wang, J., Fan, L., Liu, X., Wang, H., & Tan, W. S. (2018). Physiological responses of Chinese hamster ovary cells to a productivity-enhancing yeast extract. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(5), 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.05.005>
- Huang, C. J., Lin, H., & Yang, X. (2012, March 18). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 39, pp. 383–399. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>
- Hurtado-Guerrero, I., Hernández, B., Pinto-Medel, M. J., Calonge, E., Rodríguez-Bada, J. L., Urbaneja, P., ... Oliver-Martos, B. (2020). Antiviral, Immunomodulatory and Antiproliferative Activities of Recombinant Soluble IFNAR2 without IFN- β Mediation. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), 959. <https://doi.org/10.3390/jcm9040959>
- Imanishi, J. (2004). Basis and Clinical Applications of Interferon. *Journal of the Japan Medical Association*, 128(7), 1013–1017. Retrieved from http://www.med.or.jp/english/pdf/2004_01/007_012.pdf

- Inga, M. (2018). *Cinética de anticuerpos post-vacunación para Hepatitis infecciosa canina, Distemper canino y Parvovirus canino, utilizando una técnica semicuantitativa “dot” ELISA en fase sólida (VacciCheck®), en un refugio de la localidad de Guayllabamba – Pichincha.* Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 147(927), 258–267.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0048>
- Ito, A., Isogai, E., Yoshioka, K., Sato, K., Himeno, N., & Gotanda, T. (2010). Ability of Orally Administered IFN- α 4 to Inhibit Naturally Occurring Gingival Inflammation in Dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(9), 1145–1151. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0201>
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014, January). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 14, pp. 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Jacinavicius, F. R., De Carvalho, L. R., Carneiro, R. L., & Sant’Anna, C. L. (2018). The influence of temperature on *Radiocystis fernandoi* strain (cyanobacteria) growth and microcystin production. *Revista Brasileira de Botânica*, 41(3), 675–680.
<https://doi.org/10.1007/s40415-018-0490-8>
- Jeong, H., Kim, H. J., & Lee, S. J. (2016). Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain BL21. *Genome Announcements*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00134-15>
- Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology*, 6(8).
<https://doi.org/10.1098/rsob.160196>
- Jiang, B., Harper, M. M., Kecova, H., Adamus, G., Kardon, R. H., Grozdanic, S. D., & Kuehn, M. H. (2010). Neuroinflammation in advanced canine glaucoma. *Molecular Vision*, 16, 2092–2108. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21042562>
- Keller, N., Woytschak, J., Heeb, L. E. M., Marques Maggio, E., Mairpady Shambat, S., Snäll, J., ... Zinkernagel, A. S. (2019). Group A Streptococcal DNase Sda1 Impairs Plasmacytoid Dendritic Cells’ Type 1 Interferon Response. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(6), 1284–1293. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.11.027>
- Khoo, O., & Suntrarachun, S. (2012). Strategies for production of active eukaryotic proteins in

- bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 159–162.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60213-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60213-X)
- Kimoto, T. (1986). In vitro and in vivo Properties of the Virus Causing Natural Canine Distemper Encephalitis. *Journal of General Virology*, 67(3), 487–503. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-3-487>
- King, E. N., Pujol, A., Tamargo, B. T., Marrero, G., Fontanies, M. J., Blain, K., ... Sierra, G. (2018). Influence of the culture medium on the kinetics of growth and expression of the recombinant protein Rv2626c of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv expressed in *Streptomyces lividans* TK24. *Vaccinmonitor*, 27(3). Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-028X2018000300002&script=sci_arttext&tlng=en
- Klotz, D., Baumgärtner, W., & Gerhauser, I. (2017). Type I interferons in the pathogenesis and treatment of canine diseases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 191, 80–93. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2017.08.006>
- Klotz, D., & Gerhauser, I. (2019). Interferon-Stimulated Genes—Mediators of the Innate Immune Response during Canine Distemper Virus Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1620. <https://doi.org/10.3390/ijms20071620>
- Kotenko, S. V., Rivera, A., Parker, D., & Durbin, J. E. (2019, June 1). Type III IFNs: Beyond antiviral protection. *Seminars in Immunology*, Vol. 43, p. 101303. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101303>
- Kunert, R., & Reinhart, D. (2016, April 1). Advances in recombinant antibody manufacturing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 100, pp. 3451–3461. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7388-9>
- Kuny, C. V., & Sullivan, C. S. (2016, March 1). Virus–Host Interactions and the ARTD/PARP Family of Enzymes. *PLoS Pathogens*, Vol. 12, p. e1005453. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005453>
- Kuruganti, S., Accavitti-Loper, M. A., & Walter, M. R. (2014). Production and characterization of thirteen human type-I interferon- α subtypes. *Protein Expression and Purification*, 103, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.08.010>

- Lama, L., Adura, C., Xie, W., Tomita, D., Kamei, T., Kuryavyi, V., ... Tuschl, T. (2019). Development of human cGAS-specific small-molecule inhibitors for repression of dsDNA-triggered interferon expression. *Nature Communications*, *10*(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08620-4>
- Landolfo, S., Gribaudo, G., Angeretti, A., & Gariglio, M. (1995). Mechanisms of viral inhibition by interferons. *Pharmacology & Therapeutics*, *65*(3), 415–442.
[https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)98599-L](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)98599-L)
- Lazear, H. M., Schoggins, J. W., & Diamond, M. S. (2019, April 16). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, Vol. 50, pp. 907–923.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
- Lee, A. J., & Ashkar, A. A. (2018). The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02061>
- Lee, M. J., & Kim, P. (2018, October 26). Recombinant protein expression system in *Corynebacterium glutamicum* and its application. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 9, p. 2523. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02523>
- Lefevre, F., L'Haridon, R., Borrás-Cuesta, F., & la Bonnardiere, C. (1990). Production, Purification and Biological Properties of an Escherichia Coli-derived Recombinant Porcine Alpha Interferon. *Journal of General Virology*, *71*(5), 1057–1063.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-5-1057>
- Li, E., & Mira De Orduña, R. (2010). A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in Applied Microbiology*, *50*(3), 283–288. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02789.x>
- Li, S. fang, Zhao, F. rong, Shao, J. jun, Xie, Y. li, Chang, H. yun, & Zhang, Y. guang. (2017, November 1). Interferon-omega: Current status in clinical applications. *International Immunopharmacology*, Vol. 52, pp. 253–260.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.08.028>
- Lobetti, R. (2007). Viral diseases of the dog. Retrieved July 8, 2019, from Bryanston Veterinary Hospital website:
<https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=3860711&pid=11242&>

- Lombardi, A., Tsomos, E., Hammerstad, S. S., & Tomer, Y. (2018, November 1). Interferon alpha: The key trigger of type 1 diabetes. *Journal of Autoimmunity*, Vol. 94, pp. 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.08.003>
- Long, X., Gou, Y., Luo, M., Zhang, S., Zhang, H., Bai, L., ... Wang, D. (2015). Soluble expression, purification, and characterization of active recombinant human tissue plasminogen activator by auto-induction in *E. coli*. *BMC Biotechnology*, 15(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0127-y>
- MacMicking, J. D. (2012, May). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 12, pp. 367–382. <https://doi.org/10.1038/nri3210>
- Marín, O., Vivas, D., Neira, M., Sandoval, G. A., Marín, O., Rodríguez, A., & Chacón, R. (2020). Role of type I and type III interferons: A review of concepts. *Ágora Revista Científica*, 6(2). <https://doi.org/10.21679/ARC.V6I2.133>
- Markey, K. A., MacDonald, K. P. A., & Hill, G. R. (2013). Cytokines in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia. *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, 357–391. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416004-0.00016-1>
- Martin, V., Najbar, W., Gueguen, S., Grousson, D., Eun, H.-M., Lebreux, B., & Aubert, A. (2002). Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. *Veterinary Microbiology*, 89(2–3), 115–127. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00173-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00173-6)
- McDonough, A., Lee, R. V., & Weinstein, J. R. (2017). Microglial Interferon Signaling and White Matter. *Neurochemical Research*, 42(9), 2625–2638. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2307-8>
- Mesev, E. V., LeDesma, R. A., & Ploss, A. (2019, June 1). Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nature Microbiology*, Vol. 4, pp. 914–924. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0421-x>
- Meyer, O. (2009). Interferons and autoimmune disorders. *Joint Bone Spine*, 76(5), 464–473. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.03.012>
- Mietzsch, M., Péntzes, J. J., & Agbandje-Mckenna, M. (2019). Twenty-five years of structural

- parvovirology. *Viruses*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/v11040362>
- Miorin, L., Maestre, A. M., Fernandez-Sesma, A., & García-Sastre, A. (2017). Antagonism of type I interferon by flaviviruses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(4), 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.146>
- Miranda, C., & Thompson, G. (2016). Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *Journal of General Virology*, 97(9), 2043–2057. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540>
- Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettingell, C., Sturtevant, J., & King, J. (1991). Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science*, 253(5015), 54–58. <https://doi.org/10.1126/science.1648264>
- Moriello, K. A. (2003). Zoonotic skin diseases of dogs and cats. *Animal Health Research Reviews*, 4(2), 157–168. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15134297>
- Mosser, M., Chevalot, I., Olmos, E., Blanchard, F., Kapel, R., Oriol, E., ... Marc, A. (2013). Combination of yeast hydrolysates to improve CHO cell growth and IgG production. *Cytotechnology*, 65(4), 629–641. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9519-1>
- Nagano, Y., & Kojima, Y. (1954). Immunizing potential of vaccinia virus inactivated by ultraviolet rays. In *Seances Soc. Biol. Fil* (Vol. 148).
- Novagen. (1999). *pET System Manual*. United States.
- Pandey, S., Kawai, T., & Akira, S. (2015). Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016246>
- Pervolaraki, K., Rastgou Talemi, S., Albrecht, D., Bormann, F., Bamford, C., Mendoza, J. L., ... Boulant, S. (2018). Differential induction of interferon stimulated genes between type I and type III interferons is independent of interferon receptor abundance. *PLoS Pathogens*, 14(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007420>
- Pfaffl, M. W. (2006). *Relative quantification* (T. Dorak, Ed.). Nueva York: Taylor and Francis Group.
- Pham, P. L., Perret, S., Cass, B., Carpentier, E., St-Laurent, G., Bisson, L., ... Durocher, Y. (2005).

- Transient gene expression in HEK293 cells: Peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(3), 332–344.
<https://doi.org/10.1002/bit.20428>
- Phue, J. N., Sang, J. L., Trinh, L., & Shiloach, J. (2008). Modified Escherichia coli B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with Escherichia coli K (DH5 α). *Biotechnology and Bioengineering*, 101(4), 831–836. <https://doi.org/10.1002/bit.21973>
- Prittie, J. (2004). Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 14(3), 167–176.
<https://doi.org/10.1111/j.1534-6935.2004.04020.x>
- Ramchuran, S. O., Holst, O., & Karlsson, E. N. (2005). Effect of postinduction nutrient feed composition and use of lactose as inducer during production of thermostable xylanase in Escherichia coli glucose-limited fed-batch cultivations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(5), 477–484. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.477>
- Ramón, A., Señorale-Pose, M., & Marín, M. (2014). Inclusion bodies: not that bad.... *Frontiers in Microbiology*, 5(FEB), 56. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00056>
- Rendon, S., Da Fontoura, R., Wageck, C., & Ruiz, J. (2019, March 7). Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. *Virology Journal*, Vol. 16.
<https://doi.org/10.1186/s12985-019-1136-6>
- Rey, M. R. (2010). Caracterización demográfica de la población de perros de la comuna de Viña del Mar. *Universidad de Chile*. Retrieved from
<http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131363>
- Rinas, U., Garcia-Fruitós, E., Corchero, J. L., Vázquez, E., Seras-Franzoso, J., & Villaverde, A. (2017, September 1). Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 42, pp. 726–737. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.005>
- Rios, A. M. (2019, December 13). Companion animal health care market value in Latin America in 2018 and 2023. Retrieved March 17, 2020, from STATISTA website:
<https://www.statista.com/statistics/790130/pet-health-care-market-value-latin-america/>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019, August 1). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, Vol. 28, pp. 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Science Learning Hub. (2014). *E. coli* - The biotech bacterium. Retrieved July 2, 2019, from <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1899-e-coli-the-biotech-bacterium>
- Shepherd, J., Jones, J., Hartwell, D., Davidson, P., Price, A., & Waugh, N. (2007). Interferon alpha (pegylated and non-pegylated) and ribavirin for the treatment of mild chronic hepatitis C: a systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment (Winchester, England)*, 11(11), 1–205, iii. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17346498>
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14, 41. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>
- Singhvi, P., Saneja, A., Srichandan, S., & Panda, A. K. (2020, January 15). Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.011>
- Smith, T. G., Millien, M., Vos, A., Fracciterne, F. A., Crowdis, K., Chirodea, C., ... Wallace, R. (2019). Evaluation of immune responses in dogs to oral rabies vaccine under field conditions. *Vaccine*, 37(33), 4743–4749. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.096>
- Stadtmauer, G., & Cunningham-Rundles, C. (1997). Outcome analysis and cost assessment in immunologic disorders. *JAMA*, 278(22), 2018–2023. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9396665>
- Stanifer, M. L., Pervolaraki, K., & Boulant, S. (2019, March 2). Differential regulation of type I and type III interferon signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20061445>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>

- Taira, O., Watanugi, I., Hagiwara, Y., Takahashi, M., Arai, S., Sato, H., & Maehara, N. (2005). Cloning and expression of canine interferon-alpha genes in *Escherichia coli*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 67(10), 1059–1062. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16276065>
- Tang, M., Tian, L., Luo, G., & Yu, X. (2018, June 29). Interferon-gamma-mediated osteoimmunology. *Frontiers in Immunology*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01508>
- Teijaro, J. R. (2016, February 1). Type I interferons in viral control and immune regulation. *Current Opinion in Virology*, Vol. 16, pp. 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.001>
- tenOever, B. R. (2016, February 10). The Evolution of Antiviral Defense Systems. *Cell Host and Microbe*, Vol. 19, pp. 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.006>
- Terpe, K. (2006, September 22). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 72, pp. 211–222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>
- Thaiwong, T., Sledge, D. G., Wise, A. G., Olstad, K., Maes, R. K., & Kiupel, M. (2018). Malignant transformation of canine oral papillomavirus (CPV1)-associated papillomas in dogs: An emerging concern? *Papillomavirus Research*, 6, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2018.10.007>
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *TRIzol Reagent User Guide - Pub. no. MAN0001271 - Rev. A.0.* Carlsbad, Estados Unidos.
- Trinchieri, G. (2010, September 27). Type I interferon: Friend or foe? *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 207, pp. 2053–2063. <https://doi.org/10.1084/jem.20101664>
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., & Arakawa, T. (2003, March 1). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, Vol. 28, pp. 1–8. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00641-1](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00641-1)
- Upadhyay, V., Singh, A., Jha, D., Singh, A., & Panda, A. K. (2016). Recovery of bioactive protein from bacterial inclusion bodies using trifluoroethanol as solubilization agent. *Microbial*

Cell Factories, 15(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0504-9>

- Valadkhan, S., & Gunawardane, L. S. (2016). LncRNA-mediated regulation of the interferon response. *Virus Research*, 212, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.09.023>
- Vargas-Maya, N. I., & Franco, B. (2017). Escherichia coli as a Model Organism and Its Application in Biotechnology. In *Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. <https://doi.org/10.5772/67306>
- Vincent, H. A., Ziehr, B., & Moorman, N. J. (2017). Mechanism of Protein Kinase R Inhibition by Human Cytomegalovirus pTRS1. *Journal of Virology*, 91(5). <https://doi.org/10.1128/jvi.01574-16>
- Voorhees, I. E. H., Glaser, A. L., Toohey-Kurth, K., Newbury, S., Dalziel, B. D., Dubovi, E. J., ... Parrish, C. R. (2017). Spread of Canine Influenza A(H3N2) Virus, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), 1950–1957. <https://doi.org/10.3201/eid2312.170246>
- Wang, R., Ma, H., Kang, Y., Li, C., Li, H., Zhang, E., ... Zhao, M. (2018). Molecular Cloning and Identification of the 2′–5′ Oligoadenylate Synthetase 2 Gene in Chinese Domestic Pigs Through Bioinformatics Analysis, and Determination of Its Antiviral Activity Against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infection. *Indian Journal of Microbiology*, 58(3), 332–344. <https://doi.org/10.1007/s12088-018-0731-3>
- Yuan, T. Z., Ormonde, C. F. G., Kudlacek, S. T., Kunche, S., Smith, J. N., Brown, W. A., ... Weiss, G. A. (2015). Shear-Stress-Mediated Refolding of Proteins from Aggregates and Inclusion Bodies. *ChemBioChem*, 16(3), 393–396. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402427>
- Zhang, Q., Wang, C., Ma, F., Yao, L., Gao, H., Zhu, L., & Zheng, L. (2020). Development and biological activity of long-acting recombinant human interferon- α 2b. *BMC Biotechnology*, 20(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00605-2>
- Zheng, Y., Hao, X., Zheng, Q., Lin, X., Zhang, X., Zeng, W., ... Li, S. (2018). Canine Influenza Virus is Mildly Restricted by Canine Tetherin Protein. *Viruses*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/v10100565>
- Zhou, J., Wang, Y., Chang, Q., Ma, P., Hu, Y., & Cao, X. (2018). Type III Interferons in Viral Infection and Antiviral Immunity. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(1), 173–185. <https://doi.org/10.1159/000495172>

Zhou, P., Zeng, W., Zhang, X., & Li, S. (2017). The genetic evolution of canine parvovirus – A new perspective. *PLOS ONE*, *12*(3), e0175035.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175035>

Zhou, Z., Hamming, O. J., Ank, N., Paludan, S. R., Nielsen, A. L., & Hartmann, R. (2007). 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. *Journal of Virology*, *81*(14), 7749–7758.

<https://doi.org/10.1128/JVI.02438-06>