



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD  
ANIMAL**

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CRM1 EN CÉLULAS  
INFECTADAS POR EL VIRUS DE INFLUENZA TIPO A”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**MAURICIO AMARO NÁPOLES**

**TUTOR: ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ**

**COMITÉ TUTORAL:**

**GARY GARCÍA ESPINOSA**

**SUSANA MENDOZA ELVIRA**

**MÉXICO, D. F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **DECLARACIÓN.**

**El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.**

---

**MVZ. Mauricio Amaro Nápoles**

## **DEDICATORIA.**

**A mi madre, María Félix Nápoles Barrales.**

**A mis hermanos Othir, Yubia y Anthar.**

**A mi papá, mi tío Eras, Chata, Gon y Sol.**

**A mis tías Lupe y Vero.**

**A mis primos (hermanos) Ieshua, Alejandro (pollo) y Víctor.**

**Muy en especial a la personita que me ha dado todo su cariño, comprensión, apoyo y amor, Nayelly muchas gracias por estar a mi lado.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi “*alma mater*”, por darme una formación profesional y personal.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por darme la oportunidad de crecer y fortalecer mis conocimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, pues sin el apoyo brindado, la realización de éste trabajo hubiese sido imposible.

A mi tutor y jurado el Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por todo su apoyo en el transcurso de mi maestría y en la realización de este proyecto, muchas gracias por todos tus consejos.

A mi distinguido comité tutorial, quienes guiaron, formaron y me apoyaron en el transcurso de éste proyecto, muchas gracias Dra. Susana Mendoza Elvira y Dr. Gary García Espinosa.

A mi honorable jurado: Dr. Luis Padilla Noriega, Dra. Laura Cobos Marín, Dr. Néstor Ledesma Martínez y Dr. Eliseo Hernández Baumgarten, por sus valiosas aportaciones que contribuyeron a una mejor redacción de esta tesis.

Al Dr. Daniel Martínez Gómez, por permitirme desarrollar parte de éste trabajo en su laboratorio, por su apoyo tanto académico como personal. Muchas gracias por tus consejos y amistad, ya que sin éstos, mi formación profesional no sería completa.

Al Dr. Joaquín Delgadillo, Dra. Marcela Mercado, Dra. Georgina Robles, Dr. Jaime Robles y Dr. Rogelio Barrios por abrirme las puertas del CENASA y por su valioso apoyo para realizar este proyecto.

A todos mis amigos, amigas, carnales y familia, que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO CON EL EQUIPO E INSTALACIONES DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA AGROPECUARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA CAMPUS XOCHIMILCO Y EL LABORATORIO DE VIROLOGÍA DEL CENTRO NACIONAL DE SERVICIOS DE DIAGNÓSTICO EN SALUD ANIMAL. SIENDO RESPONSABLES DE DICHOS LABORATORIOS: DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ, DR. DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ Y DR. JOAQUÍN DELGADILLO ÁLVAREZ, RESPECTIVAMENTE.

## Resumen.

**Mauricio Amaro Nápoles.** Análisis de la Expresión de CRM1 en Células Infeccionadas por el Virus de Influenza Tipo A. Bajo la dirección de Dr. Antonio Verdugo Rodríguez, Dr. Gary García Espinosa y la Dra. Susana Mendoza Elvira

El objetivo del presente trabajo fue determinar los niveles de expresión de la proteína CRM1 en células infectadas y no infectadas, por medio de la RT-PCR en tiempo real. Las infecciones se realizaron por duplicado en células MDCK con la cepa A/Chicken/México/232/94/CPA, realizando la cosecha a las 0, 6, 12 y 18 h posinfección (PI) ya que en estos tiempos la pérdida de células a causa de la infección fue menor al 5% de la confluencia. A las células infectadas y no infectadas se les realizó la extracción del ARN por el método de TRIzol®, se realizó la RT-PCR punto final y en tiempo real. Para lo cual se diseñaron 3 juegos de iniciadores, analizados con el BLAST del NCBI para ver la homología con secuencias ahí publicadas, observando un 100% en los tres casos con las secuencias de interés; para la M1, la homología fue con varias cepas, incluyendo las de origen mexicano; para la  $\beta$ -Actina, utilizado como gen normalizador se utilizaron los iniciadores publicados por Maldonado y col. (2009); y para la CRM1 se observó la homología con secuencias de *Homo sapiens* y *Canis lupus familiaris*, ya que fueron diseñados con una base degenerada (T, ó C). El resultado de la RT-PCR punto final fueron tres bandas para cada par de iniciador, una de 346, 232 y 99 pb correspondientes a la amplificación de la secuencia de la proteína  $\beta$ -Actina, M1 y CRM1 respectivamente. Al realizar la RT-PCR en tiempo real, se analizó el “Número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanzada de cada una de las muestras, rebasa el umbral de detección” (Ct), este análisis se realizó por triplicado por cada tiempo y por cada botella y por duplicado, teniendo un número de muestra de 9 para los cálculos estadísticos, al realizar el análisis de las medias de los Cts para la  $\beta$ -Actina, se observó que eran homogéneos, es decir, con una concentración similar de ARN en todos los tiempos PI,  $P(<0.05)$ ; al realizar el mismo análisis para la CRM1, también fue igual en todos los tiempos PI, e incluso, igual que la media de la  $\beta$ -Actina, en el caso de las 6, 12 y 18 h PI, sin embargo tubo una mayor concentración de ARN en el tiempo 0. Cuando se analizó la expresión de la M1, ésta resultó ser constante en los tres tiempos PI, además de tener mayor concentración de ARN que con  $\beta$ -Actina y CRM1. Por lo cual se concluye que, en una infección, la proteína M1, se expresa de manera constante y en periodos tempranos, con el fin de realizar la exportación nuclear de las RNP. Pero si bien la exportación de la RNP depende de la proteína CRM1, en estos ensayos, no se vio afectada su expresión ya que la cantidad de ARN presente, se mantuvo constante, indicando que la expresión de este gen es suficiente para satisfacer el flujo de proteínas del VIA.

Palabras clave: Influenza, M1, CRM1, RNP, PCR en tiempo real, Expresión.

## Summary

**Mauricio Amaro Nápoles.** Expression Analysis of CRM1 in infected cells with Influenza Virus Type A. Under direction of PhD. Antonio Verdugo Rodriguez, PhD. Gary Garcia Espinosa and PhD. Susana Mendoza Elvira

The aim of this study was to determine the level expression of CRM1 protein in infected and uninfected cells using real time RT-PCR. The infections were performed in MDCK cells with A/Chicken/México/232/94/CPA strain and harvest at 0, 6, 12 and 18 hours post infection (PI) because on these time the infection cause less than 5% of cell death. The RNA extraction was with infected and uninfected cells by TRIzol® method to made real-time RT-PCR and RT-PCR endpoint. To make the RT-PCR were designed 3 sets of primers, analyzed with the NCBI BLAST to find sequence homology, having 100% in the three cases with the sequences of interest, for the M1 the sequence homology were with several Influenza strains, including the Mexican origin; for  $\beta$ -Actin used as a normalizing gene was used the primers published by Maldonado et al (2009); and for CRM1 was observed homology with sequences from *Homo sapiens* and *Canis lupus familiaris*, because The primers were designed with a degenerated base (T or C). The result of RT-PCR endpoint were bands for each pair of primer of 346, 232 and 99 bp corresponding to amplification the sequence of protein  $\beta$ -Actin, M1 and CRM1, respectively. When performing real time RT-PCR was analyzed the "Number cycle in which the fluorescence of the samples reached the detection threshold" (Ct), this analysis was performed in two bottle for each time and by triplicate obtaining a sample number of 9 for the statistic calculations, the analysis of Ct-mean for  $\beta$ -actin, were observed to be homogeneous, with a similar concentration of RNA in all times PI ( $P < 0.05$ ), to perform the same analysis for CRM1, was also equal at all times PI, even equal as the mean of  $\beta$ -actin, in the time 6, 12 and 18 h PI, however was higher the RNA concentration at time 0 h with CRM1. When analyzed the expression of the M1, it was constant in the three times PI and having higher concentration of RNA compared with  $\beta$ -Actin and CRM1. In conclusion, an infection the M1 protein is expressed consistently and in earlier periods to make nuclear export of the RNP. While the export of RNP depends of the CRM1 in these works were not affected its expression because the amount of RNA present remained constant, indicating that the expression of this gene is sufficient for the flow of proteins from VIA.

Keywords: Influenza, M1, CRM1, RNP, real-time PCR, expression.

## Lista de abreviaciones.

<b>VIA</b>	Virus de Influenza Tipo A
<b>OIE</b>	Organización Mundial de Salud Animal
<b>DINESA</b>	Dispositivo Nacional de Emergencia en Salud Animal
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>CPA</b>	Comisión México - Estados Unidos de América para la Prevención de Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucéico
<b>ADNc</b>	ADN complementaria
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucéico
<b>ARNv</b>	ARN viral
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ARNi</b>	ARN intermediario
<b>HA</b>	Hemoaglutinina
<b>NA</b>	Neuroaminidasa
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteína
<b>M1</b>	Proteína de matriz 1
<b>M2</b>	Proteína de matriz 2
<b>PB1</b>	Polimerasa B1
<b>PB2</b>	Polimerasa B2
<b>PA</b>	Polimerasa A
<b>NP</b>	Nucleoproteína
<b>NS1</b>	Proteína no estructural 1
<b>NS2</b>	Proteína no estructural 2
<b>NEP</b>	Proteína de transporte nuclear o NS2
<b>CRM1</b>	Chromosome Region Maintenance 1
<b>CPN</b>	Complejo del poro nuclear
<b>ONM</b>	Membrana nuclear exterior
<b>INM</b>	Membrana nuclear interior
<b>Nups</b>	Nucleoporinas
<b>NLS</b>	Secuencia de localización nuclear
<b>NES</b>	Secuencia de exportación nuclear
<b>P-NES</b>	Proteína-NES
<b>MDCK</b>	Madin-Darby Canine kidney
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa
<b>EP</b>	Embrión de pollo
<b>ALPES</b>	Aves Libres de Patógenos Específicos, S.A.
<b>LA</b>	Líquido alantoideo
<b>CENASA</b>	Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>MEM</b>	Minimum Essential Medium
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>PI</b>	Posinfección
<b>HA</b>	Hemoaglutinación

<b>UHA</b>	Unidades hemoaglutinantes
<b>DEPC</b>	Dietil-pirocarbonato
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>Cts</b>	Punto en el cual la fluorescencia alcanzada de cada una de las muestras rebasa el umbral de detección de fluorescencia
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool

# ÍNDICE GENERAL

<b>1 - Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades	1
1.2 Historia y evolución de los VIA	2
1.3 Características del virus	6
1.4 Ciclo viral	7
a) Entrada del virus a la célula y liberación del material genético	8
b) Replicación del genoma y producción de proteínas virales	9
c) Ensamble y liberación de los viriones infectantes	11
1.5 Transporte Nuclear de las Proteínas y RNP virales	13
1) Importación de las RNP virales al Núcleo	17
2) Exporte de las ARNm virales	18
3) Importación de las proteínas estructurales y no estructurales.	18
4) Exporte de las RNP virales	19
1.6 Justificación	21
<b>2 - Hipótesis y Objetivos</b>	<b>22</b>
2.1 Hipótesis	22
2.2 Objetivo general	22
2.3 Objetivos específicos	22
<b>3 - Material y Métodos</b>	<b>23</b>
3.1 Virus y sistemas vivos	23
3.2 Infección en cultivo celular	24
3.3 Titulación del virus	24
3.4 Extracción de ARN	25
3.5 Planeación de iniciadores	25
3.6 Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en punto final y tiempo real	27
3.7 Análisis estadístico	29

<b>4 - Resultados</b>	<b>30</b>
4.1 Infección en cultivo celular	30
4.2 Titulación del virus	31
4.3 Extracción de ARN	32
4.4 Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en punto final y tiempo real	33
4.5 Análisis estadístico	41
<b>5 - Discusión</b>	<b>44</b>
5.1 Conclusión	47
<b>6 - Bibliografía</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b>	Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la RT-PCR.	27
<b>Cuadro 2</b>	Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la PCR en Tiempo Real.	28
<b>Cuadro 3</b>	Medias y desviaciones estándar (D.E.) calculadas a partir de los resultados de Cts de cada uno de los amplificadores de la PCR en Tiempo Real.	38
<b>Cuadro 4</b>	Resultados del ANDEVA realizado para los Cts resultados de el PCR en tiempo real, para comparar las diferentes medias, tomando los valores de las tiempos y sus replicas que fueron analizadas.	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema de las estructuras del Complejo del Poro Nuclear (CPN)	14
<b>Figura 2</b>	Esquema del mecanismo de importación y exportación de proteínas (carga) a través del CPN	16
<b>Figura 3</b>	Esquema de la importación de las proteínas del VIA al núcleo	19
<b>Figura 4</b>	Esquema de la exportación de la RNP del núcleo al citoplasma	20
<b>Figura 5</b>	Fotografía a 10X con filtro de luz verde del monoestrato de células MDCK células no infectadas	30
<b>Figura 6</b>	Fotografía de un gel de agarosa al 2% en TAE, teñido con bromuro de Etidio, donde se observa el resultado de la extracción de ARN y convertido en ADNc por transcripción reversa	33
<b>Figura 7</b>	Esquema de los resultados obtenidos por el BLAST del NCBI, donde se muestra la homología que existe entre los iniciadores para la proteína M1, $\beta$ -Actina y CRM1 con diferentes secuencias	34
<b>Figura 8</b>	Fotografía de un gel de agarosa al 2% en TAE, teñido con bromuro de Etidio, donde se observan los productos de amplificación por RT-PCR punto final	36
<b>Figura 9</b>	Resultados de la amplificación por PCR en tiempo real de los tres genes, M1, $\beta$ -Actina y CRM1.	37

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	Resultado de la titulación del virus eliminado en el sobrenadante de las células infectadas, expresado en Unidades Hemoaglutinantes	32
Gráfica 2	Valores promedios de las Cts del PCR en tiempo real para la $\beta$ -Actina	39
Gráfica 3	Valores promedios de las Cts del PCR en tiempo real para la proteína M1	39
Gráfica 4	Valores promedios de las Cts del PCR en tiempo real para la proteína CRM1	40
Gráfica 5	Valores promedios de las Cts del PCR en tiempo real para la $\beta$ -Actina (Azul), CRM1 (Rojo) y M1 (Amarillo)	41

# 1 - Introducción.

## 1.1 - Generalidades

El virus de Influenza tipo A se encuentra dentro de la Familia *Orthomyxoviridae*, junto con los virus de la influenza tipo B, tipo C, Isavirus (virus de la anemia del salmón) y Thogotovirus (virus de vertebrados, insectos y ácaros). Los tipos A, B, C del virus de la influenza afectan a la mayoría de los vertebrados (Bischoff y col.2007).

Los virus de Influenza tipo A (VIA), históricamente han causado importantes epizootias de enfermedades respiratorias agudas en diferentes especies animales, incluyendo al hombre (Mahy y col.1998). Se han aislado de varias especies animales, como cerdos, equinos, mamíferos marinos, humanos y principalmente en aves, lo que habla de la capacidad del virus para infectar distintas especies animales (Horimoto y col.2001, Saif y col. 2003).

La enfermedad en aves es conocida como Influenza Aviar, la cual se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, particularmente entre las aves silvestres y casualmente puede afectar a las aves domésticas (gallinas, pollos y pavos), ocasionando importantes pérdidas económicas a causa de las medidas sanitarias que se toman en un brote por influenza aviar, principalmente la de alta patogenicidad (Saif y col. 2003, OIE 2000).

En los últimos años, ha emergido una grave epizootia de influenza aviar en varios países, que tiene un impacto importante en la salud animal y representa un riesgo potencial para la salud pública. Esta enfermedad, producida por una cepa altamente patógena del virus de influenza aviar, ha generado importantes pérdidas económicas en la producción avícola, principalmente por su elevada mortalidad y por las repercusiones que el control de esta enfermedad conlleva, como: el sacrificio de aves, cuarentena de la zona afectada, vacunación, monitoreo

epidemiológico constante y la limitación del comercio regional e internacional. Por tanto, representa una amenaza para la subsistencia de los productores, especialmente en los países en vías de desarrollo (OIE 2005). La importancia del virus de influenza aviar altamente patógeno en salud pública, radica en la variabilidad genética de las proteínas Hemoaglutinina y Neuroaminidasa, que se encuentran en su superficie, confiriéndole en ocasiones la capacidad de infectar otros hospederos, como por ejemplo al humano (McCauley y col.1983).

Entre los países que desde 2007 a la fecha han reportado brotes de Influenza Aviar de alta patogenicidad se encuentra Alemania, Austria, Bulgaria, Bangladesh, Canadá, China, Corea, Dinamarca, Egipto, España, Francia, Grecia, Hungría, India, Irak, Italia, Japón, Reino Unido, Rumania, Rusia, Suiza, Vietnam y otros países de Asia y África (OIE 2009). Cabe mencionar en este punto que en 1995 México padeció un brote de influenza aviar de alta patogenicidad, el cual fue controlado en pocos meses. Actualmente México se encuentra libre de influenza aviar de alta patogenicidad y mantiene una campaña permanente para su control (NOM-044-ZOO-1995).

## **1.2 - Historia y evolución de los VIA**

Los VIA generalmente son encontrados en aves acuáticas, aves zacundas y gaviotas, las cuales son los reservorios naturales del virus. En estas aves, el virus se replica primariamente en el tracto digestivo, ya que generalmente las aves se infectan por vía oral, sin causarles la enfermedad, pero eliminando al virus por las heces, infectando a otras aves y con ello, se tiene el ciclo de manera enzootica. Sin embargo, los VIA se han establecido en diferentes mamíferos, incluido el hombre, limitado en este último a los serotipos H1, H2, H3, N1 y N2, que han causado grandes epidemias en el mundo (Baigent y col.2003). La mayoría de las transmisiones a otras especies como las aves de corral, caballos, focas, ballenas, cerdos y humanos se refleja en una enfermedad subclínica, en algunos casos con un cuadro respiratorio leve, siendo esta transmisión el resultado de la habilidad de

replicarse en otros hospederos, por la presencia de diferentes cambios en el genoma del virus, por mutaciones. Por otro lado, se desconocen muchas cosas acerca de este virus antes de la mitad del siglo XIX, pero se cree que la población humana ha sido infectada por el virus de la influenza tipo A desde hace miles de años, con cambios periódicos en los subtipos circulantes, propiciando el reordenamiento de los segmentos del virus, adquiriendo nuevos segmentos de otros subtipos, principalmente de los subtipos aviáres (Parrish y col.2005). Las grandes epidemias ocasionadas por el virus de la influenza en el siglo pasado fueron tres; en 1918 fue reconocido un virus del subtipo H1N1 (llamado virus de influenza española), la pandemia causó la muerte de aproximadamente 20 millones de personas en todo el mundo. Posteriormente en 1957 se presentó otra pandemia, llamada “influenza asiática”, causada por el subtipo H2N2. Y por último, en 1968 apareció una pandemia que ocasionó menor mortalidad que las anteriores y fue llamada “la gripa de Hong Kong”, identificada como del subtipo H3N2 (Lone 1999).

Ya que el genoma de los VIA es de tipo segmentado, las epidemias y la habilidad de infectar otros hospederos puede estar determinada por el rearreglo de los segmentos del virus, siempre y cuando se presente una infección de dos virus de Influenza tipo A en una misma célula, es decir al replicarse virus diferentes, estos pueden cambiar de segmentos al momento de encapsidarse y por lo tanto, dar lugar a un nuevo tipo viral que contiene las características de los segmentos del virus original, más las características de los segmentos del otro virus (Ito y col.1998).

Se ha comprobado que en las pandemias de 1957 y 1968, los virus presentan rearreglo de segmentos, pues poseen genes de virus de influenza de humanos y de aves. En el mismo sentido, la aparición de estas nuevas variantes, puede ser el resultado de la infección de los dos virus simultáneamente infectando una célula, ésta no necesariamente humana, sino también en un hospedero intermediario, como puede ser el cerdo ya que en estudios realizados en tráqueas

se encontraron similitudes en los receptores, pues presentan características de los receptores de las aves y de los humanos (Ito y col.1998).

En México, un brote de VIA tipo H5N2 de alta patogenicidad se registró en diciembre de 1994, y fue erradicado en junio de 1995 mediante la aplicación de medidas contra epidémicas de emergencia previstas y operadas por el Dispositivo Nacional de Emergencia en Salud Animal (DINESA), manteniendo desde entonces un programa activo de vigilancia epidemiológica (NOM-044-ZOO-1995). En esas mismas fechas, Garcia y Fraire publicaron que durante el otoño de 1993, se presentaron problemas en aves de postura, aumentando la mortalidad en diferentes zonas avícolas. En diciembre de 1993 se aisló un virus hemoaglutinante y al realizarle la prueba de seroneutralización con un antisuero anti H2 en embrión de pollo, resultó positivo, pero no se realizó ninguna notificación oficial (García y Méndez 1996 y Fraire y Paz 1995). En abril de 1994, en tres granjas de pollo de engorda en los estados de México, Querétaro e Hidalgo, se incrementó la mortalidad hasta alcanzar un 31.8% acumulado. Las muestras de estas granjas fueron remitidas para el diagnóstico entre el 27 y 28 de abril, obteniendo como resultado el aislamiento de un virus hemoaglutinante, compatible con el VIA. Después de verificar estos resultados, el líquido alantoideo fue remitido a la Comisión México - Estados Unidos de América para la Prevención de Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas (CPA) para confirmar el diagnóstico (García y Méndez 1996). El 24 de mayo se confirmó y se notificó oficialmente la presencia del VIA, subtipo H5N2 en dichas parvadas, siendo aislado por el MVZ Gay y colaboradores, identificándose como virus de baja patogenicidad (Gay y col.1994). Posteriormente se realizaron estudios de monitoreo de las parvadas presentes en los diferentes estados de la república para ver la prevalencia del virus, aislándose el virus en un 27% del total de la parvadas en el Estado de México, 25% Jalisco, 22% Querétaro, 7% Guanajuato, 5% Puebla, 4% en Morelos y Guerrero y el 2% en Aguascalientes, Hidalgo y Veracruz (García y Méndez 1996). El 7 y 13 de enero de 1995 fue confirmado el diagnóstico del VIA tipo H5N2 de alta patogenicidad en Atongo estado de Querétaro y en tres granjas de Tehuacan,

estado de Puebla respectivamente y de inmediato por acciones del DINESA, se reforzaron en esta zona las acciones de cuarentena estricta para evitar la movilización de aves y subproductos. El 31 de enero de 1996 se declararon oficialmente libres los estados de Campeche, Chihuahua, Durango, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora y Yucatán; los estados sin presencia de anticuerpos eran Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Colima, Chiapas, Nayarit, Tabasco, Tamaulipas y Zacatecas (López y col.1996).

Estudios realizados en las cepas de baja y alta patogenicidad aisladas a partir de los brotes de 1995, arrojan la hipótesis de que el virus pudo ser introducido a México a partir de una cepa proveniente de América del Norte por aves acuáticas silvestres y su subsiguiente infección y replicación en aves domésticas generó una mutante virulenta. Esta mutación se presentó en el sitio de corte de la hemoaglutinina, el cual es necesario para la fusión de la proteína con el endosoma y así liberar el material genético del virus (información más detallada en el inciso 1.4-a), presentando la secuencia de aminoácidos característica de los virus de alta patogenicidad (Horimoto y col.1995).

Se ha comprobado que el rearrreglo de los segmentos del virus no sólo se da en un hospedero intermediario sino que puede ser en el mismo reservorio y originar un nuevo tipo viral, que pueda ser capaz de infectar otro hospedero o simplemente el virus por tener mutaciones en su genoma, aumenta su patogenicidad y/o la capacidad de infectar otros hospederos. Por ejemplo, desde 1996 se han presentado cerca de 130 casos de transmisión del virus de influenza aviar a humanos, pero esta no es una nueva variante, sino que análisis genéticos han demostrado que de los 8 segmentos del virus, sólo el segmento que codifica la proteína Hemoaglutinina (HA) tiene variaciones, pero no es una substitución de segmentos, sino que fue producto de una mutación en la proteína que le confirió la posibilidad de infectar a otros huéspedes (Shoham 2006).

Sin embargo, a pesar de que existen muchos avances científicos respecto a la evolución del virus en las diferentes poblaciones, los tipos virales emergentes en el siglo pasado, no siguen un patrón biológico regular, sino que simplemente reflejan la constante adaptación del virus a los cambios de comportamiento y movimiento de las poblaciones en el mundo, por lo tanto, no se puede predecir el momento en el cual pudiera aparecer una nueva variante causante de una nueva epidemia (Parrish y col.2005).

### **1.3 - Características del virus**

Los virus de influenza tipo A se distinguen de los tipos B y C por diferencias en la Nucleoproteína (NP) y en la proteína de Matriz (M1). Los virus del tipo A son pleomorfos, aunque generalmente tienen forma esférica. Son virus de tamaño intermedio que miden aproximadamente 120 nm de diámetro y poseen envoltura. Su ácido nucleico es de tipo ARN, de cadena sencilla, en sentido negativo, que en suma mide aproximadamente 13,600 nucleótidos. El genoma del VIA está dividido en 8 segmentos, los cuales codifican para diez proteínas, dos de ellas son de superficie (HA y NA), dos más forman la matriz proteica del virus (M1 y M2), cuatro interaccionan con el ARN viral (PB1, PB2, PA y NP) y dos no estructurales (NS1 y NS2) (Shaw y col.1992, Mahy y col.1998, Horimoto y col.2001, McClauley y col.1983, Webster y col.1992).

Adherido a cada segmento del VIA, se encuentra la proteína NP y el complejo polimerasa, que se compone de 3 proteínas, la PB1, PB2 y PA. La PB2 está codificada en el segmento 1 y se encarga de reconocer a los ARN mensajeros (ARNm) celulares con CAP. La proteína PB1 está codificada en el segmento 2 y funciona como ARN polimerasa y endonucleasa, ésta última actividad es importante ya que corta, junto con el CAP, 10 -13 nucleótidos de los ARNm celulares los cuales son utilizados como cebadores para síntesis de los mensajeros virales. La proteína PA está codificada en el segmento 3 (Webster y col.1992) y aparentemente es importante para la replicación del genoma viral

independiente de cebador, ya que se ha demostrado que es esencial para la formación de ARNv y que tiene actividad de proteasa (Hara y col.2001). La Hemoaglutinina (HA) es el mayor antígeno de superficie, es la responsable de la unión al receptor de la célula y es codificada en el segmento 4; la Nucleoproteína (NP) es codificada en el segmento 5, se une al ARN viral y es la proteína mayoritaria de la ribonucleoproteína (RNP) y se cree que participa en la activación de la actividad polimerasa para la formación de ARNv; la proteína Neuroaminidasa (NA) es codificada en el segmento 6 y es la segunda proteína de superficie, su función es la de liberar a la partícula viral de la superficie celular, cortando la unión con el ácido siálico de las glicoproteínas. Las proteínas M1 y M2 son codificadas en el segmento 7, el cual es bicistronico, ya que por medio de edición del ARN, se pueden originar las dos proteínas, la proteína estructural de matriz M1 y la proteína M2 que es integral de membrana, forma un tetrámero, funcionando como un canal de protones para controlar el pH del interior del virus. Las proteínas NS1 y NS2 se codifican en el segmento 8, siendo también este segmento bicistronico. Ambas proteínas intervienen en la replicación viral (Webster y col.1992).

Los VIA se dividen en 16 subtipos por diferencias en la proteína Hemoaglutinina (H), y en 9 subtipos por diferencias en la proteína Neuroaminidasa (N) (Mahy y col.1998, McClauley y col.1983, Horimoto y col.2001, Shaw y col.1992). El sistema de nomenclatura para las diferentes cepas de influenza debe incluir en primer lugar el tipo, posteriormente el hospedero donde fue aislado, seguido del sitio geográfico, la identificación de la cepa y el año de aislamiento. La descripción antigénica de H y N se coloca al final y entre paréntesis, por ejemplo A/Chicken/Pensilvania/1370/83 (H5N2).

#### **1.4 - Ciclo viral**

El ciclo de los VIA comprende, primero, la entrada a la célula hospedero y liberación del material genético, posteriormente, la producción de las proteínas

virales, tanto estructurales como no estructurales y por último, el ensamble y liberación de los viriones infectantes fuera de la célula.

#### **a) Entrada del virus a la célula y liberación del material genético**

Los VIA, como todos los virus, primero debe unirse a un receptor específico que se encuentra en la superficie de la célula hospedero y esta unión marca, tanto el tropismo del virus, como el tipo de hospedero que va a infectar (Lanzrein y col.1994). Estos receptores son glicoproteínas de la membrana celular con residuos de ácido siálico, los cuales se unen a las HA del virus (Lanzrein y col.1994, Steinhauer 1999, Skehel y col.2000). Posteriormente, el virus es endocitado por la acción de proteínas llamadas clatrininas, que se encuentran en el interior de la célula, organizándose para formar una red por debajo del sitio de unión virus-célula, propiciando la penetración del virus en una vesícula endosomal. Una vez dentro del endosoma, el virus lleva a cabo dos fenómenos crucialmente importantes; primero, la HA sufre un corte en su estructura por proteasas celulares, para poder ser dividida en dos subunidades, HA1 y HA2. Ya presentes estas dos subunidades, el endosoma se acidifica a un pH de 6-5; el segundo fenómeno es, permitir la fusión de la HA con la membrana endosomal y con ello la liberación del material genético del virus dentro de la célula hospedero (Horimoto y col.2001, Lanzrein y col.1994, Steinhauer 1999, Skehel y col.2000). En el tráfico endosomal, el VIA es transportado en endosomas tempranos donde se cree que se lleva a cabo el corte de la HA, posteriormente el endosoma se fusiona con un endosoma tardío y es ahí donde se acidifica el microambiente, para permitir que active su canal iónico por medio de la proteína M2 y así provocar una acidificación interna. Juntos estos procesos, conllevan a la fusión de la HA con la membrana endosomal, formando un poro y con ello la liberación del genoma viral en el citoplasma (Steinhauer 1999, Lakadamyali y col.2004). Antes de la liberación del genoma, el virus cruza la matriz citoplasmática en tres fases, la primera de ellas es dependiente de actina y la vesícula que contiene al virus se localiza en la periferia de la célula, en la segunda fase es dependiente de dineína de los microtúbulos,

tomando la vesícula un rápido y unidireccional movimiento hacia el núcleo y en la tercera utiliza los microtúbulos para llegar a la región perinuclear, donde se lleva a cabo la acidificación de la vesícula y la liberación del genoma viral (Lakadamyali y col.2004). Una vez liberado el ARN viral en forma de Ribonucleoproteína (RNP), es llevada de manera intacta por transporte activo al núcleo (Martin y Helenius 1991a).

### **b) Replicación del genoma y producción de proteínas virales.**

Los VIA tienen su ARN viral (ARNv) asociado a 4 proteínas, formando un complejo llamado Ribonucleoproteína de las cuales, tres de ellas, la PA, PB1 y PB2, forman el complejo polimerasa que tiene varias actividades, como de la de endonucleasa y ARN polimerasa dependiente de ARN, estas dos actividades son básicas en la síntesis de ARNv y transcripción de ARNm virales (Hara y col.2006, Ishihama y col.1996). La otra proteína es la núcleo proteína (NP) que es la más abundante en la RNP, encontrándose una NP cada 20 nucleótidos. Esta NP tiene una actividad de cinasa (fosforila a la proteína no estructural NS1), además de que la unión de varias de estas proteínas con el ARNv le da una conformación de horquilla con una región circular terminal (Hara y col.2006, Ishihama y col.1996, Portela y col.2002).

La transcripción del genoma viral comienza con el secuestro de un ARNm celular el cual tiene unido en su extremo 5' una molécula de 7 metil-guanosina, este ARNm sirve como cebador para la síntesis ARNm viral maduro. El complejo polimerasa del virus por su actividad endonucleasa, corta fragmentos del ARNm con CAP de la célula hospedera y los usa como iniciadores, por lo tanto, cada fragmento de ARNm viral contiene aproximadamente 12 bases de ARN de la célula y el restante es el ARN del virus. Como en la parte final del ARNv hay una secuencia corta de poli-uracilo (poli-U), cuando se produce el ARNm viral el complejo polimerasa transcribe repetidamente esta secuencia para poder formar la secuencia de poli-adenina (poli-A). Una vez que se acumula la nucleoproteína viral

NP, se forma un ARN que va a servir de molde o ARN intermediario (ARNi) que no requiere cebador con CAP y a partir de este ARNi, se harán las copias perfectas del ARNv que comenzarán otro ciclo o se empaquetarán para formar viriones completos (Portela y col.2002). Al mismo tiempo de la síntesis del ARNm viral, la proteína no estructural NS1 se une a una proteína celular, llamada PABII (por sus siglas en inglés poly(A) binding protein II), la cual tiene la función de estimular a la polimerasa sintetizadora de la cadena de poli-A. Al estar unida a la NS1 a la PABII, inhibe su función, impidiendo la formación de cadenas de poli-A en los ARNm celulares y con ello se hace deficiente este proceso, por otro lado, se hace más eficientemente la producción de los ARNm virales. Aunado a esto, la proteína NS1 inhibe la exportación de los ARNm celulares al citoplasma, impidiendo la traducción de las proteínas celulares (Chen y col.1999). En la interferencia de la maquinaria de transcripción y la localización intracitoplasmática de los ARNm virales, no se debe a secuencias contenidas en la región no traducible del extremo 5' (UTR-5') de los ARN del virus, como se pensaba antes, ya que se ha comprobado que expresando las proteínas virales, en ausencia del UTR-5' del virus, la maquinaria de transcripción de los ARNm celulares se sigue viendo afectada e inhibida, indicando que la interferencia, es debida a la presencia de proteínas virales (Casseti y col.2001).

La síntesis de ARNm y ARNv, se da de manera normal en 6 de los 8 segmentos del genoma viral, ya que cada uno de éstos, codifica para una sola proteína (HA, NA, PA, PB1, PB2 y NP). Los otros dos segmentos que codifican cada uno para dos proteínas (una codifica a M1 y M2 y el otro a NS1 y NS2), tienen un proceso de edición del ARNm, ya que cuentan con 2 diferentes marcos de lectura, propiciando la producción de las proteínas M1 o M2 y de las proteínas NS1 o NS2. El proceso para producir una u otra proteína, parece estar relacionada con la presencia de la proteína NP (Horimoto y col.2001).

Por otra parte se sabe que los VIA tienen una frecuencia de mutación muy elevada, ya que al ser de tipo ARN, la ARN polimerasa dependiente de ARN es

una proteína viral y carece de editor, de echo este es el caso de los virus ARN estudiados hasta ahora. Esto hace que cada base tenga un índice de mutación de  $6.7 \times 10^{-3}$  por año (Anwar y col.2006).

### **c) Ensamble y liberación de los viriones infectantes.**

Para que se realice el ensamble y la liberación del virus, se deben llevar a cabo varios procesos, como son la producción de todas las proteínas externas del virus y su transporte hasta la membrana celular, posteriormente el transporte de la proteína que forma la matriz viral al mismo sitio y por último el transporte de la RNP viral a la membrana, llevándose estos procesos casi al mismo tiempo. De tal forma, en la transcripción y traducción, primero se forman proteínas tempranas, la NP, PA, PB1, PB2, NS1 y NS2, las cuales ayudan a la replicación y transcripción eficiente del genoma viral. Posteriormente se producen las proteínas tardías que son al M1, M2, HA y NA, que sirven para el transporte de componentes del virus a la membrana celular y forman la envoltura del virus (Nayak y col.2004).

Las proteínas HA, NA y M2 (glicoproteínas), deben ser transportadas y colocadas en la membrana celular, ya que éstas forman parte de la envoltura del virus, para ello, las tres proteínas usan una vía exocítica de la célula para colocarse en la membrana celular. Estas tres proteínas se sintetizan en polirribosomas asociados al retículo endoplásmico, en donde son insertadas, ya que HA y NA cuentan con un dominio transmembranal y otro intracitoplasmático. Posteriormente son transportadas al aparato de Golgi y de ahí son colocadas en la membrana en zonas conocidas como balsas lipídicas (lipid rafts), las cuales son ricas en esfingolípidos, proteínas y colesterol. Por otro lado, a diferencia de la HA y la NA, la M2 no necesita específicamente las zonas lipid raft para ser colocada en la membrana celular (Nayak y col.2004). La HA y la NA interactúan con la proteína M1 en el sitio de formación del nuevo virión, asociándose la HA por medio de su región intracitoplasmática y su dominio transmembranal a la M1 y esta asociación es necesaria para una eficiente formación de viriones (Ali y col.2000).

La proteína M2 funciona principalmente como un canal de protones, necesario para la eficiente liberación del genoma durante la entrada del virus a la célula, sin embargo tiene una región citoplasmática que se une a la proteína M1 para poder formar la matriz viral, siendo éste diferente a los residuos que forman el canal de protones (McCown y Pekosz 2006).

La RNP, es transportada del núcleo al citoplasma con ayuda de la M1 a través de la vía del complejo del poro nuclear (Martin y Helenius 1991a) y posteriormente a la membrana con la ayuda de 3 proteínas, la NP, la NS2 y M1, siendo ésta última crítica para el proceso, ya que en su ausencia, el transporte no es posible. La M1 se une a la RNP viral junto con la NS2 (o NEP por sus siglas en inglés “*nuclear export protein*”), este complejo posteriormente se une a la Exportina 1 (CRM1) para poder cruzar el poro nuclear (Elton y col. 2001, Watanabe y col. 2001, Akarsu y col. 2003) y poder llegar por el citoplasma al lugar de ensamble, ayudados por componentes del citoesqueleto, particularmente microfilamentos (Nayak y col.2004).

Simultáneamente, la M1 es transportada a las zonas donde se localizan los dominios intracitoplasmáticos de las HA y NA. La M1 interactúa con RNA viral y con las proteínas externas HA y NA, de tal forma que cuando existe una concentración adecuada de la M1 adherida a la membrana con su asociación a la RNP viral, se dice que el ensamble está listo y se inicia la liberación del virus, formándose una protuberancia en esta zona, creciendo paulatinamente hasta formar una vesícula que contiene en la parte externa la HA y NA, seguida por la matriz asociada a la RNP viral, para concluir en la liberación del virus. En este último paso, la proteína NA, elimina la unión con el ácido siálico, lo que permite la disociación de la membrana celular con la envoltura del virus (Nayak y col.2004). Sin embargo, en ensayos *in vitro* se ha demostrado que aún en ausencia de la proteína NA hay formación de partículas virales, sin embargo, éstas se encuentran agregadas entre ellas o adheridas a la membrana celular (Gómez-Puertas y col.1999).

La proteína que se encuentra en mayor cantidad por partícula viral es la M1, ya que hay aproximadamente 3000 copias por cada virión infectante (Mahy y col.1998). Esta proteína desempeña diversas funciones en el ciclo viral, ya que además de que forma la matriz viral, da soporte y mantiene protegido al genoma viral y ayuda en el transporte del genoma del virus, desde el núcleo hasta el sitio de ensamble. Una vez transportado el genoma, la M1 se acumula en el mismo sitio para propiciar la formación de la vesícula que dará origen a otra partícula viral (Sha y col.1997).

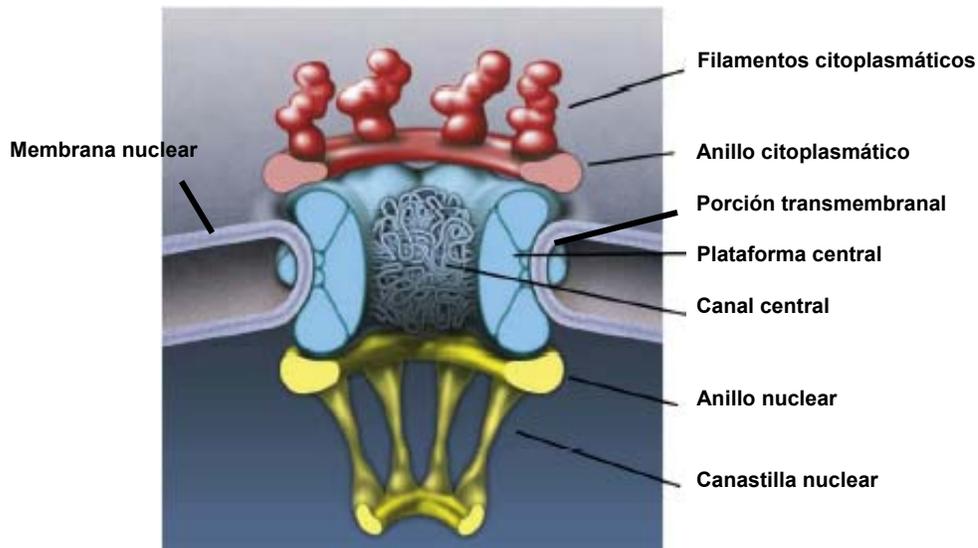
### **1.5 – Transporte Nuclear de las proteínas y RNP virales.**

Como la replicación del genoma se lleva a cabo en el núcleo de la célula infectada, tanto los ARNm, las RNP y las proteínas estructurales y no estructurales deben entrar y salir de éste durante todo el proceso de infección (Figura 3). Al igual que las proteínas nucleares y los ARN celulares, los componentes del virus deben atravesar el poro nuclear, ya que es la puerta de entrada y salida, por lo cual, a continuación y antes de entrar en materia, se describirán los componentes de ésta estructura tan importante.

El poro nuclear se compone de una serie de proteínas que atraviesan la envoltura nuclear, que consta de dos bicapas lipídicas, llamadas membrana nuclear exterior y membrana nuclear interior (ONM e INM respectivamente). El poro se forma de aproximadamente 30 diferentes proteínas, llamadas nucleoporinas o Nups, que en su conjunto integran al “complejo del poro nuclear” (CPN). El CPN es una estructura de ocho lados con un canal central; tiene una plataforma central, que le sirve de soporte y anclaje a la envoltura nuclear (Núcleo del CPN), una porción transmembranal y dos anillos periféricos, uno hacia el núcleo y otro al citoplasma. Del anillo citoplasmático se desprenden ocho filamentos, uno por lado, pero cada uno independiente, contrario a los filamentos que se encuentran en lado del núcleo, los cuales están unidos, formando una

canastilla, como se muestra en la figura 1 (Albet y col. 2007, D'Angelo y Hetzer 2008, Capelson y Hetzer 2009).

Figura 1. Esquema de las estructuras del Complejo del Poro Nuclear (CPN), tomado de D'Angelo y Hetzer 2008



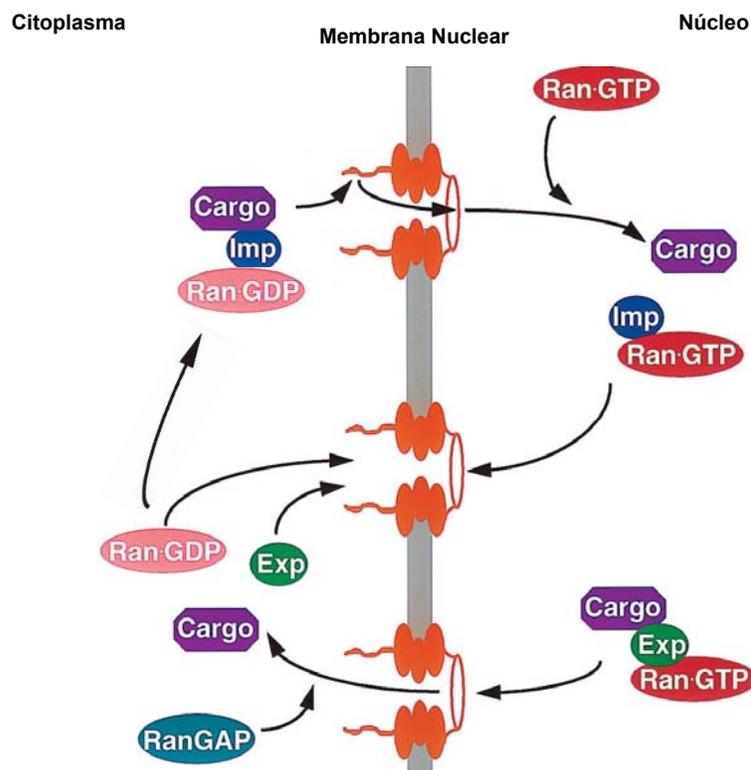
Las Nups tienen varios dominios, de ellos, el más importante es la fracción de repetición alanina-glicina (FG). Las Nups que tienen el dominio FG se encuentran principalmente en la plataforma (Mosammaparast y Pemberton 2004, Albet y col. 2007), llenando el canal central desde la porción nuclear hasta la citoplasmática, haciendo la función de barrera, para realizar un transporte selectivo (Ribbeck y Golrich 2001).

Existen dos maneras de importar proteínas celulares y virales al núcleo; las proteínas que son menores a 40kDa pasan al núcleo por medio de difusión pasiva; y algunas de estas proteínas pequeñas, junto con todas las que son mayores de 40kDa requieren un transporte activo (D'Angelo y Hetzer 2008). El transporte activo depende casi en su totalidad de la presencia de algunos aminoácidos de la proteína que se va a transportar, a lo que se le nombra "Secuencia de localización nuclear" (NLS por sus siglas en inglés), la cual es reconocida por un complejo de proteínas llamadas carioferinas (Kaps). Las carioferinas, también llamadas importinas o exportinas, pertenecen a la familia de proteínas implicadas en el

transporte nucleocitoplasmático, son moléculas formadas por dos tipos principales de compuestos, las alfa importinas y las beta importinas, que funcionan juntas para transportar moléculas a través del complejo poro nuclear. Algunas otras proteínas, como la de unión a GTP y GDP (Ran-GTP y Ran-GDP), se unen a las importinas y participan en el proceso de transporte. Una vez unidas las importinas beta-1 y alfa-1 y 2 a la proteína con su NLS, ayudadas de las Ran-GDP y algunas Nups (Nup 358, 214, 98 y 153), pueden atravesar el CPN como se muestra en la figura 2; posteriormente, las importinas son recicladas y transportadas de nuevo al citoplasma (Moroianu 1998, Mosammaparast y Pemberton 2004).

En la exportación del núcleo al citoplasma, existe un grupo de proteínas, carioferinas beta-2 o exportinas, las cuales reconocen otra secuencia de aminoácidos en las proteínas, llamada “secuencia de exportación nuclear” (NES por sus siglas en inglés). Las exportinas facilitan la translocación de muchas proteínas, ARNs y partículas de RNP a través del poro nuclear. De todas las exportinas caracterizadas de vertebrados el receptor de exportación CRM1 o exportina-1 tiene la gama más grande proteínas substrato, como son: factores transcripcionales, reguladores del ciclo celular, proteínas presentes en complejos de RNP, importinas, factores de traducción nuclear y citoplasmático (Fornerod y col. 1997, Kutay y Güttinger 2005) y las subunidades ribosomales (Zemp y Kutay 2007). Las proteínas substrato de la CRM1 contienen la secuencia corta de leucinas llamada NES, pero comparativamente con otros complejos exportina-substrato, la afinidad de la proteína-NES (P-NES) actualmente caracterizadas con el CRM1 es relativamente baja (Kutay y Güttinger 2005). La exportación de las proteínas por medio de la CRM1 es dependiente de Ran-GTP, formando el complejo P-NES-CRM1-Ran-GTP, como se muestra en la figura 2. Al pasar éste complejo por el CPN, el Ran-GTP se hidroliza por acción de la Ran-GAP, que se encuentra en el citoplasma propiciando la liberación de P-NES, el CRM1 y el recién formado Ran-GDP, el cual, será reutilizado por las Importinas para llevar proteínas al núcleo (Cullen 2000).

Figura 2. Esquema del mecanismo de importación y exportación de proteínas (carga) a través del CPN, donde la proteína se une a la Importina específica (Imp) y esta a su vez al Ran-GDP para ser importada al núcleo. Posteriormente en el núcleo, Ran-GDP es transformada en Ran-GTP, la cual se une a una Exportina (Exp) que unida una proteína que se va a exportar, cruzan el CPN, hidrolizando al Ran-GTP a Ran-GDP por acción de la proteína Ran-GAP, tomado de Cullen 2000.



Las investigaciones sobre la unión de CRM1 a algunas proteínas blanco, sugieren que la unión P-NES-CRM1 en el núcleo es estimulada por un cofactor específico, el Ran-BP3, ya que estabiliza la unión P-NES-CRM1-Ran-GTP y a una óptima concentración, la exportación de proteínas con NES es más eficiente (Englmeier y col. 2001). De igual manera, para la exportación de las subunidades ribosomales al citoplasma se requieren de adaptadores específicos como la proteína Nmd3p para la subunidad 60S, o Rio2p para la 40S (Zemp y Kutay 2007).

Dentro del transporte nuclear de una célula infectada con el VIA, ocurren cuatro eventos: 1) la importación de las RNP virales del o los viriones recién penetrados a la célula, 2) la exportación de los ARNm virales para la síntesis de proteínas, 3) la importación de las proteínas estructurales y no estructurales recién

sintetizadas y 4) la exportación de las RNP virales completas recién formadas (Martin y Helenius 1991b).

### **1) Importación de las RNP virales al núcleo.**

Una vez que el virus fue endocitado y se acidificó el endosoma, la importación de la RNP viral solo es posible cuando la M1 se disocia de la partícula viral y de la RNP para poder ingresar por un proceso activo (Whittaker y col. 1996, Martin y Helenius 1991b). Hay evidencia de que la RNP viral, es transportada de manera intacta al complejo del poro nuclear por medio de un transporte activo, sin la intervención de microtúbulos ni microfilamentos (Martin y Helenius 1991a). Babcock y col. encontraron que la RNP es transportada por el citoplasma (y en núcleo) por difusión, hasta llegar a la envoltura nuclear. Inmediatamente después la RNP interactúa con proteínas del CPN (Babcock y col. 2004). La RNP es importada al núcleo por la NLS presente en las proteínas asociadas al ARN, como la NP, requiriendo factores de transporte como son Importinas, Ran y p10 (O'Neill y col. 1995). La NP tiene en su porción N-terminal un NLS convencional, sin embargo se ha demostrado la presencia de otros NLS adicionales no convencionales. La NLS que es necesaria para la importación de las RNP es una no convencional, ya que inhibiendo esta región, la NP no se puede unir a la Importina  $\alpha$  y no se logra la importación al núcleo (Cros y col. 2005). Posteriormente se encontró que la NP tiene al menos dos NLS que intervienen en su importación al núcleo, una en la fracción N-terminal (NLS1) y otra en medio de la proteína (NLS2) (Wang y col. 1997, Neumann y col. 1997 y Weber y col. 1998). Ambas NLSs intervienen de manera independiente una de otra, ya que inhibidas por separado baja la importación de las RNP al núcleo, pero no se bloquea, contrario a la inhibición de ambas al mismo tiempo, que resulta en el bloqueo total de la importación de la RNP (Wu y col 2007), sin embargo, cuando las RNP de nueva formación son exportadas al citoplasma, se oculta la NSL1, para que la RNP no sea reimportada al núcleo (Wu y Panté 2009).

## **2) Exportación de los ARNm virales.**

Todos los ARNm que son sintetizados en el núcleo son exportados al citoplasma a través del CPN (incluyendo los ARNm virales). La exportación nuclear de los ARNm se lleva a cabo por medio de un complejo de proteínas que interactúan con los mensajeros y con el CPN. El ARNm de nueva formación (pre-ARNm) se asocia a varias proteínas como las proteínas de unión al CAP, ribonucleoproteínas heterogéneas (hnRNP) factores de edición de ARN y factores de procesamiento de ARN. Todo en conjunto, es reconocido por la maquinaria de exportación propiciando su salida del núcleo, ya que contienen secuencias NES (Chen y Krug 2000, Erkmann y Kutay 2004). En el caso de la exportación de ARN virales, se ha comprobado que es independiente del CRM1, en cuyo caso podría estar involucrada la función de la RNA polimerasa II, asociado a la NS1 y la proteína TAP/p15 (Amorim y col. 2007, Wang y col. 2008).

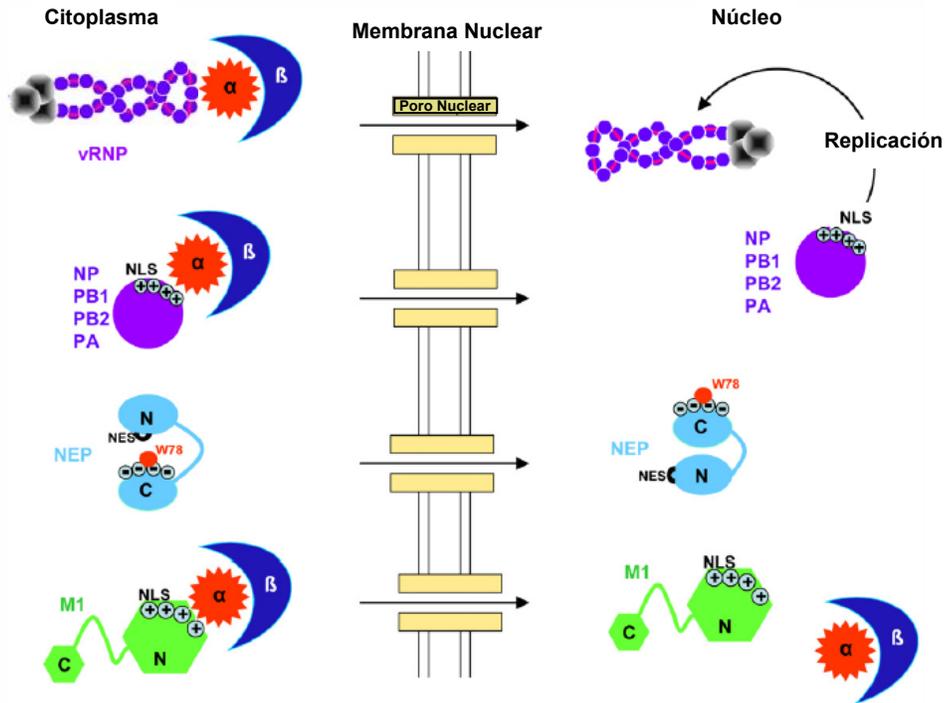
En la infección por virus generalmente los productos de ellos se ven favorecidos por diferentes factores, en el caso del VIA, la exportación de ARNm celulares se ve afectado principalmente por acción de la proteína NS1, la cual inhibe proteínas que se encuentran involucradas en la maquinaria de exportación de ARNm como es NXF1/TAP, P15/NXT, entre otras, favoreciendo así, la exportación de los ARNm virales (Satterly y col. 2007).

## **3) Importación de las proteínas estructurales y no estructurales.**

Todas las proteínas del VIA son traducidas en el citoplasma, de ellas, tres son parte de la envoltura del virus y una vez sintetizadas son llevadas al sitio de ensamble (HA, NA y M2) y las otras siete una vez sintetizadas son importadas al núcleo para cumplir su función (M1, PB1, PB2, PA, NP, NS1 y NEP). En éste proceso, primero son sintetizadas las proteínas tempranas que forman parte de la RNP viral, (PB1, PB2, PA y NP), la NS1 y la NS2 o NEP, posteriormente, se sintetizan las proteínas tardías y dentro de ellas esta la M1. Cada una de estas

proteínas cuenta con un NLS en particular, propiciando así la unión con su proteína transportadora específica (figura 3), como por ejemplo las importinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 5$  para la NP (Boulo y col. 2007).

Figura 3. Esquema del importación de las proteínas del VIA al núcleo donde se muestra el sitio de unión a las Importinas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) para poder cruzar el CPN, tomado de Boulo y col. 2007.

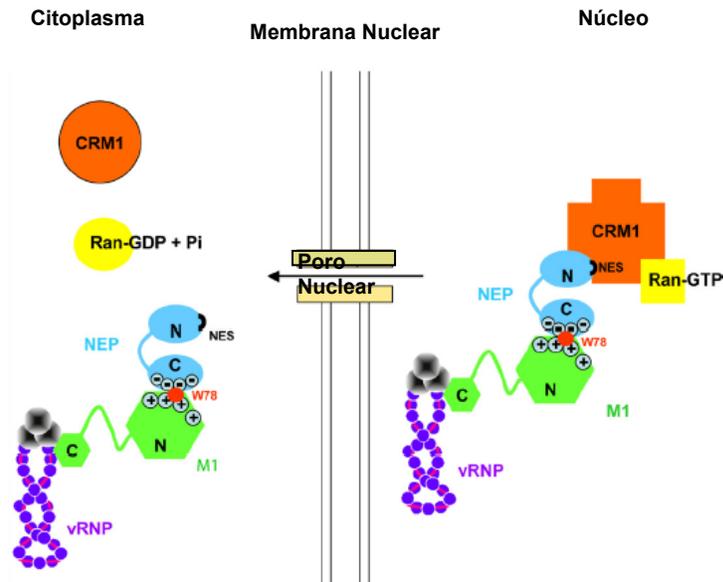


#### 4) Exportación de las RNP virales.

Una vez iniciada la replicación del ARN viral y el inicio de la formación de las nuevas RNP, comienza la exportación al citoplasma, para posteriormente poder llegar al sitio de ensamblaje del virus y la formación de la partícula viral completa. La exportación nuclear depende de CRM1, ya que éste transporte puede ser inhibido con la adición de leptomomicina B (Elton y col. 2001, Watanabe y col. 2001, Akarsu y col. 2003). Al parecer, las proteínas que forman a la RNP viral, no contienen elementos de exportación nuclear (Elton y col. 2001), sin embargo, como se mencionó anteriormente, la exportación de la RNP viral depende de dos proteínas, la M1 y la NEP (Neumann y col.2000, O'Neill y col.1998, Bui y col. 2000). La proteína M1 tienen dos dominios, uno N-terminal donde se encuentra la

NLS y otro C-terminal responsable de la unión con la RNP viral (Baudin y col. 2001), a pesar de ello, la M1 no tiene el necesario NES para la exportación nuclear, pero si se encuentra en el dominio N-terminal de la proteína NEP (O'Neill y col 1998), que al ser mutada ésta región, se da una infección retardada (Horimoto y col. 2004). Investigaciones han confirmado que la NEP se une a la CRM1 *in Vitro* (Neuman y col.2000) además de que incubados con Ran-GTP y Ran-GAP, el GTP es hidrolizado, como evidencia de la interacción entre ellas. En la parte media del dominio C-terminal de la NEP se exponen dos aminoácidos, responsables de la unión con la M1, de tal forma que al formarse el complejo NEP-M1-RNP, la M1 está unida por su porción C-terminal con la RNP y por su porción N-terminal con la NEP, perdiendo con ello su NLS, por otro lado la NEP unida a la M1, deja libre su dominio N-terminal, con el cual se une a la CRM1 y esta última se une con la Ran-GTP, para tener el complejo completo y poder ser exportado del núcleo, como se muestra en la figura 4 (Akarsu y col. 2003).

Figura 4. Esquema de la exportación de la RNP del núcleo al citoplasma, donde se representa la formación del complejo RNP-M1-NEP-CRM1-Ran-GTP necesario para poder cruzar el CPN, para después ser liberado el CRM1 y el Ran-GDP que se formo por la hidrólisis del Ran-GTP, tomado de Boulo y col. 2007.



## 1.6 – Justificación

Tanto la importación y exportación de la RNP, requieren de dos partes: primero, de las proteínas virales que juegan el papel principal y después de las proteínas celulares, las cuales, realizan las mismas funciones en la célula. La utilización de la maquinaria celular por parte de los virus es comúnmente estudiada y documentada. Refiriéndonos al proceso de exportación de las RNP de nueva formación del núcleo al citoplasma, el virus utiliza el mecanismo común de la célula, la vía del CRM1 (Elton y col. 2001); sin embargo, quedan algunas interrogantes por responder, como por ejemplo, si para formar una partícula infecciosa se requieren de ocho RNPv, que deben ser primero exportadas del núcleo por la M1 y NEP al sitio de ensamblaje y aproximadamente en una baja multiplicidad de infección, en 5 h se producen cerca de 8,000 viriones nuevos (Sidorenko 2004), ¿cómo es que el virus resuelve el problema de disposición de CRM1 para lograr este eficiente transporte de las RNP del núcleo al citoplasma?

Para poder contestar ésta pregunta, en el presente trabajo se realizaron ensayos para comparar la expresión de CRM1 en células MDCK no infectadas contra la expresión de la misma en células infectada con el VIA.

## **2 – Hipótesis y Objetivos.**

### **2.1 - Hipótesis.**

Si la proteína CRM1 es necesaria para la exportación de las RNPv del núcleo al citoplasma en células infectadas con el VIA, entonces su expresión estará aumentada para permitir un ensamblaje eficiente de viriones

### **2.2 - Objetivo general.**

Determinar los niveles de expresión de la proteína CRM1 en células infectadas o no con el VIA por medio de la RT-PCR en Tiempo Real, con el fin de establecer su nivel de expresión.

### **2.3 - Objetivos específicos.**

- 2.3.1 Establecer una cinética de infección del VIA en células MDCK, con el fin de establecer los tiempos en los cuales las células replican eficientemente al virus.
- 2.3.2 Medir los niveles de expresión de la proteína CRM1 en células MDCK infectadas y no infectadas con el VIA.
- 2.3.3 Analizar los resultados por medio de análisis de varianza.

### **3.- Material y Métodos**

#### **3.1 - Virus y sistemas vivos.**

Se utilizaron embriones de pollo (EP) ALPES® (Aves Libres de Patógenos Específicos, S.A., México) de 11 días de edad, inoculados en la cavidad alantoidea con la cepa 232 del virus de influenza aviar tipo A, subtipo H5N2 de baja patogenicidad (A/Chicken/México/232/94/CPA), donada por la Comisión México - Estados Unidos de América para la Prevención de Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas (CPA), a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La replicación del virus y los ensayos de infección se realizaron en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), en el área de diagnóstico virológico del laboratorio de diagnóstico de enfermedades de las aves. Brevemente, se examinó el EP, y se marcó el límite de la cámara de aire, se desinfectó la zona y se perforó el punto de inoculación. Los EP se inocularon con 0.5 ml del líquido alantoideo donde fue replicada la cepa 232 y se incubaron a 37°C con 70-80 % de humedad. A las 24 h se revisaron los EP inoculados y se desecharon los muertos y el líquido alantoideo (LA) infectado se cosechó a las 72 h, corroborándose la infección con la técnica de Hemoaglutinación-Inhibición de la Hemoaglutinación.

Se utilizó la línea celular MDCK (por sus siglas en inglés Madin-Darby Canine kidney), adquiridas con anterioridad del American Type Culture Collection (ATCC) por departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM. Las células fueron reproducidas en botellas (Sarstedt, USA) de 25 centímetros cuadrados con Minimum Essential Medium (MEM, Invitrogen, USA), con 2 mM de L-glutamina (Gibco BRL, UK ) y 7.5% de bicarbonato de sodio (Gibco BRL, UK ) adicionado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Invitrogen, USA) y 100 U de penicilina (Gibco BRL, UK ), incubadas a 37° C con un ambiente de 5% de bióxido de carbono. Las células fueron desprendidas con 2 ml de una solución de tripsina (TripLE Express®, Gibco BRL) y lavadas con PBS (137 mM de cloruro de sodio

(Productos Químicos Monterrey S.A.), 2.7 mM de cloruro de potasio (JT Baker, Mex), 10 mM de fosfato de sodio (JT Baker, Mex), 2mM de fosfato de potasio (JT Baker Mex), pH de 7.4.

### **3.2- Infección en cultivo celular**

Una vez alcanzada la confluencia de 70 %, se retiró el medio de 8 botellas , se adicionaron 2 ml de medio mezclado con LA infectado (1:1), titulado a 512 UHA, por mililitro, distribuido uniformemente por toda la monocapa, posteriormente se incubó a 37°C, con una agitación suave cada 30 min. A las 2 h posinfección (PI) se retiró el medio de la botella y se adicionaron 7 ml de medio limpio, se incubó de la misma manera y se realizó la cosecha a diferentes h, hasta encontrar los tiempos óptimos PI. Para la cosecha, primero se retiró el medio que contenía las partículas virales liberadas y se guardó a -70°C para su posterior titulación por HA, después se realizaron 4 lavados del estrato con PBS para retirar las partículas virales que pudieran estar en la superficie de las células, se adicionaron 750 ml de solución de TRIzol Reagent® (Invitrogen, USA) a cada botella y se incubó por 5 min, colectando al lisado en un tubo de 1.5 ml y se guardó a -70°C para realizar la extracción de RNA.

### **3.3– Titulación del virus.**

La titulación del virus de referencia, así como la titulación de los sobrenadantes del cultivo celular infectado, resultantes de la cinética de infección, fueron titulados por Hemoaglutinación (HA), siguiendo el protocolo que se indica en la Norma Oficial Mexicana NOM-044-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra La Influenza Aviar, expresando el resultado en Unidades Hemoaglutinantes (UHA).

### **3.4 - Extracción de ARN**

El ARN del líquido alantoideo de la cepa 232 y de las infecciones en las células MDCK fue extraído de la siguiente manera: se descongelaron los tubos que tenían el lisado celular con el TRIzol reagent®, se agitó en un homogeneizador eléctrico por 15 seg, se incubó a temperatura ambiente por 5 min y terminado este tiempo se centrifugó (Eppendorf, USA) a 13,000 X g por 10 min. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se adicionaron 200 µl de cloroformo (Mallinckodt Specialty Chemicals Co., USA), homogenizándose por 15 seg, para después incubar la mezcla a temperatura ambiente por 3 min. Posteriormente se centrifugó (13,000 X g) por 15 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo, adicionándole 500 µl de isopropanol (Merck KGaA, Germany). Se homogeneizó por 15 seg y se incubó por 10 min a temperatura ambiente para después centrifugar a 13,000 X g por 10 min. Se retiró el sobrenadante, se adicionaron 1 ml de etanol (Merck KGaA, Germany) al 75% y se homogeneizó suavemente. Se centrifugó a 13,000 X g por 5 min y se retiró el sobrenadante para secar la pastilla que contenía el ARN a temperatura ambiente. La pastilla que contenía al ARN se suspendió en 40 µl de agua tratada con dietil-pirocarbonato (Sigma-Aldrich Inc., USA) (DEPC) al 0.1%. Finalmente, se incubó a 95°C por 2 min e inmediatamente después se colocó en hielo. La solución con el ARN obtenido, se fraccionó en 4 tubos de 10 µl cada uno y se guardaron a -20°C para su posterior uso en los ensayos de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en punto final y en tiempo real.

### **3.5 - Planeación de iniciadores.**

Los iniciadores para amplificar la secuencia que codifica para la proteína M1 se diseñaron a partir de la secuencia del segmento 7 del genoma de la cepa 232, reportada en el *GeneBank* del *Nacional Center of Biotechnology Information* (NCBI), con número de acceso AAR91545. Para el diseño de estos iniciadores, se comparó la secuencia de la cepa 232 con varias cepas de influenza, incluyendo

las de tipo H5 aisladas en México, con el programa de análisis de secuencias Genetix®. Con base en las homologías y las diferencias encontradas en las secuencias analizadas, se diseñaron los siguientes iniciadores:

M1-VIA-1: 5'-ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG-3'

M1-VIA-2: 5' -CGCTCACTGGGCACGGTGA- 3'

La posición de estos iniciadores dentro del segmento 7 es del nucleótido 26 al 47 y del 222 al 241 para cada uno, respectivamente. Este par de iniciadores amplifican parte de la secuencia codificante de la proteína M1 de 215 pb.

Se utilizó como gen normalizador el de la  $\beta$ -Actina, el par iniciadores amplifican un fragmento de 394 pb, los cuales fueron tomados de Maldonado y col. 2009. La secuencia de estos iniciadores es la siguiente:

Actin1: 5'-AAATCGTGCGTGACATTAAG-3'

Actin2: 5'-GAGTACTTGCGCTCAGGA-3'

Estos iniciadores fueron diseñados a partir de la secuencia reportada en el GeneBank, con número de acceso EF036500.

La secuencia utilizada para la planeación de los iniciadores que amplifican un fragmento de la secuencia que codifica para la proteína CRM1 se diseñaron a partir de la secuencia de *Canis lupus familiaris*, reportada en el NCBI, con número de acceso XM\_860691. Para su diseño, se compararon varias secuencias ya reportadas, incluyendo las de *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Canis lupus familiaris*. Con base en las homologías y las diferencias encontradas en las secuencias analizadas, se diseñaron los iniciadores de tipo degenerados:

TR-Crm1-For: 5` - ATG GCT TGT GAT ACT TTY ATT AAA ATA GC - 3`

TR-Crm1-Rev: 5` - CAA AAT TTC ATC AAT AAA TGG CAT - 3`

Donde la letra Y representa la Citosina o Timina. La posición de estos iniciadores dentro de la secuencia es del nucleótido 1855 al 1883 y de 1930 al 1953 para cada uno respectivamente. Este par de iniciadores amplifican una secuencia de 99 pb.

### **3.6- Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) Punto Final y en Tiempo Real.**

La RT-PCR punto final se utilizó para corroborar la infección en cultivo celular por el VIA y para confirmar la amplificación de los fragmentos esperados para cada iniciador planeado. La transcripción reversa para formar el ADN complementario se realizó con el Juego comercial Super Script™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) y la amplificación de las secuencias correspondientes, se realizó con el juego comercial Taq ADN polimerasa recombinante (Taq DNA Polimerase, Recombinant Invitrogen, USA). En ambos casos, siguiendo las indicaciones del fabricante, con volumen de reacción final de 25 µl, utilizando una concentración final de 6 pM, la mezcla se colocó en un termociclador TC-512 (Techne, UK) con las condiciones referidas en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la RT-PCR.**

<b>CICLO</b>	<b>TEMPERATURA Y TIEMPO.</b>	<b>NUM. DE CICLOS</b>
Transcripción Reversa	42° C / 60 min.	1
Desnaturalización Inicial	94° C / 5 min.	1
Desnaturalización	94° C / 1 min.	30
Alineamiento	55° C / 30 seg	
Elongación	72° C / 1 min.	
Extensión Final	72° C / 7 min.	1

El producto obtenido por la RT-PCR fue visualizado por electroforesis en un gel de agarosa (Invitrogen, USA) al 1% en solución TAE (2 mM de EDTA pH 8, 40 mM de TRIS, 19 mM de ácido acético), teñido en una solución de bromuro de etidio (Sigma Chemicals Co., USA) al 0.001%.

Para el análisis de expresión de la proteína CRM1, el gen normalizador ( $\beta$ -Actina) y la cinética de infección con el VIA, se utilizó la RT-PCR en tiempo real, utilizando el juego comercial SYBR® GreenER™ Two-Step qRT-PCR Kit Universal (Invitrogen, USA). La prueba contó de 2 pasos: uno para la síntesis del ADN complementario y el segundo para la amplificación de los segmentos planeados, siguiendo las especificaciones del fabricante. La reacción de PCR en tiempo real se realizó en el termociclador LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science, USA), en formato de placa de 96 pozos, utilizando 1  $\mu$ M de cada uno de los iniciadores. Las condiciones de ciclo se enlistan en el cuadro 2.

**Cuadro 2. Condiciones de temperatura, tiempo y ciclos utilizados en la PCR en Tiempo Real.**

<b>CICLO</b>	<b>TEMPERATURA / TIEMPO.</b>	<b>NO. CICLOS</b>
Activación	95° C / 5 min.	1
Desnaturalización	95° C / 10 seg.	30
Alineamiento	60° C / 15 seg	
Elongación	72° C / 40 seg.	
Alineamiento ( <i>Melting</i> )	95° C / 10 seg 65°C / 1 min.	1

El ARN que se utilizó en la reacción de PCR en tiempo real se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA), posteriormente, se realizaron las diluciones pertinentes con agua tratada con DEPC.

### **3.7– Análisis Estadístico.**

Para analizar los resultados de la PCR en tiempo real, se utilizó el resultado del número de ciclos (Cts) donde se detecta la fluorescencia, que se define como el punto en el cual la fluorescencia alcanzada de cada una de las muestras rebasa el umbral de detección de fluorescencia (*Threshold*). A estos Cts, se les calculó el promedio y su desviación estándar para realizar gráficas y poder ser analizados con el paquete estadístico SPSS aplicando la técnica de Análisis de Varianza (ANDEVA) para la comparación de dos o más medias. Previo al ANDEVA, se realizó el análisis para ver si los datos se distribuían de manera normal y si tenían homogeneidad de varianzas. Para todos los análisis se utilizó un intervalo de confianza del 95% ( $P(<0.05)$ ).

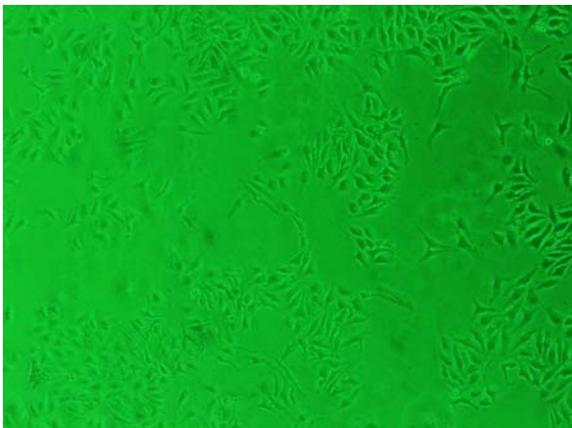
## 4 - Resultados.

### 4.1 - Infección en cultivo celular

La infección en cultivo celular se realizó en un laboratorio de seguridad biológica tipo 2 perteneciente al área de virología del CENASA, siguiendo las normas de seguridad. Se realizó una cinética de infección con el fin de conocer en qué tiempo post-infección las células, además de contener ARN viral y estar eliminando viriones, se mantuvieron en monoestrato con la misma confluencia de 70-80%. Los diferentes ensayos mostraron que a las 24 h, el monoestrato que en un principio había sido del 80% (figura 5 a), se encontraba a una confluencia del 60% a causa del daño ocasionado en las células por la multiplicación viral (figura 5 c). Éste fenómeno se observó mucho más marcado a las 48 h (figura 5 d), donde el monoestrato se encontraba en un 50% ó menos. Por otra parte, a las 18 h PI (figura 5 b), la confluencia no se había reducido demasiado lo que nos permitió extracciones más eficientes de ARN (figura 5).

**Figura 5. Fotografía a 10X con filtro de luz verde del monoestrato de células MDCK células no infectadas: a); células infectadas con la cepa 232 del VIA: b), c) y d). Donde se observa, a) células sin infectar, b) células a las 18 h PI, c) células a las 24 h PI y d) células a las 48 h PI.**

a)



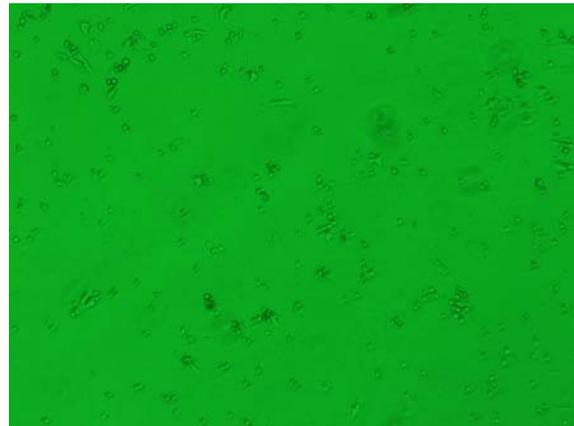
b)



c)



d)



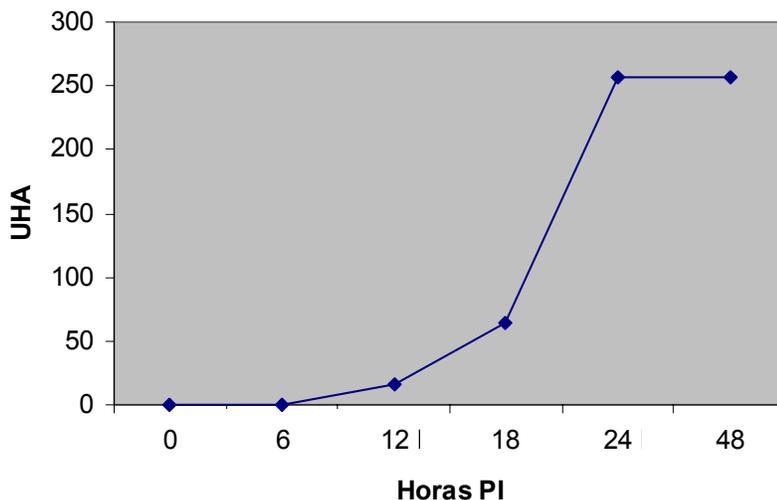
Una vez establecido el tiempo límite de 18 h como aquel en el cual la confluencia de las células no mostraba diferencias significativas, se realizó una nueva cinética, haciendo observaciones a las 6, 12 y 18 h PI. En estos tres tiempos el desprendimiento de las células a causa de la infección viral era bajo o sin cambio aparente, como se esperaba (Figura 5a y 5b); posterior a este tiempo las células comenzaban a redondearse para después desprenderse del fondo de las placas debido a la infección viral (Figura 5c).

#### **4.2-Titulación del virus**

Paralelamente, con el experimento anterior se cuantificó la producción de viriones en los distintos tiempos PI, ya que si bien se necesitaba trabajar con el menor número de células desprendidas, también era necesario mantener una curva donde se observara un crecimiento en la producción de viriones. Así que dado que se tenían tres tiempos PI en los cuales la confluencia se mantenía, se realizó nuevamente una cinética de infección en botellas de 25cm<sup>2</sup> por duplicado, identificándose cada una con la hora de cosecha y la letra A y B para cada replica (0A y 0B las células no infectadas, 6A y 6B las cosechadas a las 6 h PI, 12A y 12B las cosechadas a las 12 h, 18A y 18B las cosechadas a las 18 h). En cada tiempo PI, el medio de cada una de las cajas fue recuperado y las células del monoestrato

fueron tratadas para recuperar el ARN total. Con el ARN se verificó la presencia de una infección activa por medio de RT-PCR empleando los iniciadores para la proteína M1 (dato no mostrado). Al analizar por HA los sobrenadantes de cada tiempo y ensayo, se observó un incremento en el título de HA lo cual demostró la presencia de una infección viral creciente. Para el tiempo 0 PI, a pesar de que la infección se realizó con 512 UHA, el análisis del sobrenadante no mostró ninguna actividad de HA. Lo mismo se observó después a las 6 h PI donde el título se mantuvo en 0 UHA. Sin embargo a las 12 y 18 h el título aumentó a 16 y 64 UHA, respectivamente, lo que indicó un aumento gradual en la producción de viriones en las células infectadas. Para el caso de las primeras cinéticas de infección donde el sobrenadante se recuperó y analizó a las 24 y 48 h, las UHA fueron de 256 para ambas (Gráfica 1).

**Gráfica 1** donde se muestra el resultado de la titulación del virus eliminado en el sobrenadante de las células infectadas, expresado en Unidades Hemoaglutinantes

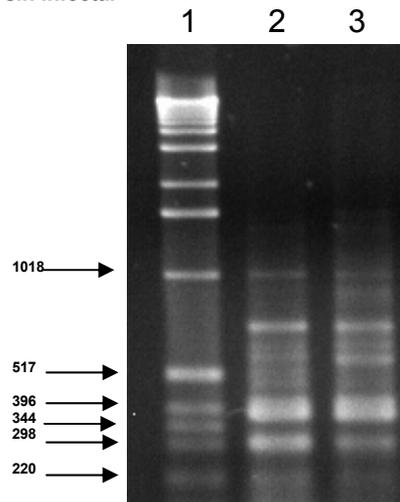


### 4.3- Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se ocupó el método convencional con TRIzol®, y se hizo con células infectadas y no infectadas. El ARN obtenido de cada extracción se suspendió en 40 µl de agua tratada con DEPC y se colocó a 95°C

por 2 min para desnaturalizar el ARN e inactivar las posibles contaminaciones por nucleasas, inmediatamente después se colocó en hielo. Todo el ARN extraído se fraccionó en 4 tubos de 10  $\mu$ l, los cuales fueron guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente una de las alícuotas se empleó para realizar una transcripción reversa usando como iniciador a oligonucleótidos dT (SYBR® GreenER™ Two-Step qRT-PCR Juego Universal (Invitrogen, USA)), para formar ADNc, el cual fue visualizado en un gel de agarosa (figura 6). Los resultados encontrados en esta parte mostraron que el ADNc sintetizado a partir del ARN producto de la extracción fue de buena calidad, sin contaminaciones, con bandas bien definidas (Figura 6). Todo el ARN fue cuantificado con un Nanodrop®, resultando valores de entre 1000 y 3000 ng/  $\mu$ l de ARN por muestra. Antes de iniciar la RT-PCR en tiempo real, se realizaron diluciones de cada muestra para poder ajustar este a 500 ng por reacción.

Figura 6. Fotografía de un gel de agarosa al 2% en TAE, teñido con bromuro de Etidio, donde se observa el resultado de la extracción de ARN, ya convertido en ADNc por transcripción reversa. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen, USA), el carril 2 y 3 muestra el resultado de la síntesis de DNAc a partir del ARN de células sin infectar



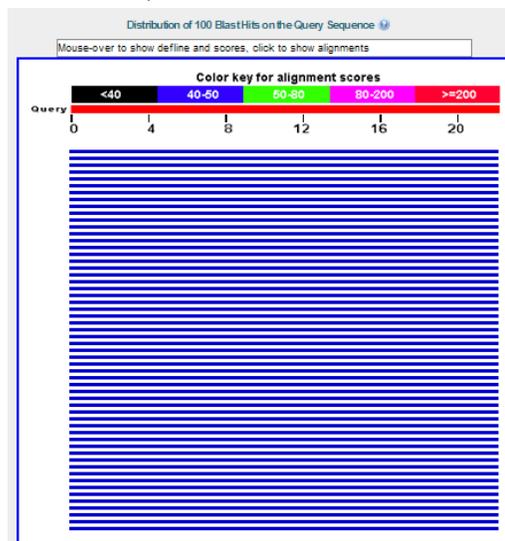
#### 4.4 Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) Punto Final y en Tiempo Real.

Previo a su síntesis, los iniciadores diseñados en este trabajo, fueron analizados con el programa Blast del *Nacional Center of Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), con el fin de conocer su homología con otras

secuencias reportadas. Los resultados obtenidos para la proteína M1 mostraron una homología del 100% de los iniciadores, con la mayoría de las cepas de Influenza tipo A, incluyendo las cepas de origen Mexicano (Figura 7A, 7B). Al realizar la RT-PCR con el ARN extraído de la cepa 232, se logró la amplificación de un fragmento de ADN de aproximadamente 215 pb (Figura 8), correspondiente a la secuencia de la proteína M1.

Figura 7. Esquema de los resultados obtenidos por el BLAST del NCBI, donde se muestra la homología que existe entre los iniciadores para la proteína M1,  $\beta$ -Actina y CRM1 con diferentes secuencias. A) las líneas de color azul representan que en el alineamiento, las cepas muestran el 100% de homología con las diferentes secuencias existentes, realizado por el BLAST. B) listado de las diferentes secuencias con la cual se tiene un 100% de homología con la M1 (incluyendo las cepas Mexicanas), C) con la  $\beta$ -Actina y D) con la CRM1 cuando en el iniciador, la base degenerada es T o E) cuando la base es C.

A)



Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">GU053522.1</a>	Influenza A virus (A/mallard/Maryland/242/2001(H2N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU053514.1</a>	Influenza A virus (A/mallard/Maryland/324/2003(H2N3)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052748.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Pennsylvania/10210/1986(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052740.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Pennsylvania/4104/1983(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052733.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Jalisco/228-4471/1998(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052726.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Tabasco/234-8289/1998(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052720.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Vera Cruz/232-6169/1998(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052714.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Morales/227-4353/1998(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052707.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Jalisco/230-4956/1998(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052699.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Morales/28159-538/1995(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052691.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Mexico/28159-541/1995(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052683.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Hidalgo/28159-232/1995(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052676.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Puebla/28159-474/1995(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052668.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Puebla/14586-654/1994(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052660.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Mexico/31381-991/1994(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052652.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Guanajuato/28159-546/1995(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052645.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Texas/298313-2/2004(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052637.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/El Salvador/102711-2/2001(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052629.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Guatemala/45511-1/2000(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052613.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Mexico/22184/1998(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052605.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Chiapas/15408/1997(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052597.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Chiapas/15406/1997(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052589.1</a>	Influenza A virus (A/chicken/Mexico/37821-771/1996(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052581.1</a>	Influenza A virus (A/mallard/Netherlands/2/2005(H4N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052573.1</a>	Influenza A virus (A/mallard/Sweden/21/2002(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%
<a href="#">GU052565.1</a>	Influenza A virus (A/mallard/Sweden/7/2002(H5N2)) segment 7	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%	0.005	100%

### C)

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">FJ664149.1</a>	Mesocricetus auratus gamma actin cytoplasmic 1 mRNA, partial cds	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">AK316361.1</a>	Homo sapiens cDNA, FLJ79260 complete cds, highly similar to Actin,	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">EU887951.1</a>	Oreochromis niloticus beta-actin mRNA, partial cds	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">AK304552.1</a>	Homo sapiens cDNA FLJ52842 complete cds, highly similar to Actin,	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">AK301372.1</a>	Homo sapiens cDNA FLJ55253 complete cds, highly similar to Actin,	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">XR_044465.1</a>	PREDICTED: Equus caballus misc RNA (LOC100054512), miscRNA	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">NG_007992.1</a>	Homo sapiens actin, beta (ACTB) on chromosome 7	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">NM_001101.3</a>	Homo sapiens actin, beta (ACTB), mRNA	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">AB385102.1</a>	Synthetic construct DNA, clone: pF1KB5455, Homo sapiens ACTB q	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">CU680417.1</a>	Synthetic construct Homo sapiens gateway clone IMAGE:100017100	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">CU680416.1</a>	Synthetic construct Homo sapiens gateway clone IMAGE:100017100	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">AK308277.1</a>	Homo sapiens cDNA, FLJ98225	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">AK309997.1</a>	Homo sapiens cDNA, FLJ17039	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">EF036500.1</a>	Homo sapiens beta-actin mRNA, partial cds	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">DQ894128.2</a>	Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE:100008588; FLH167	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">DQ890960.2</a>	Synthetic construct clone IMAGE:100003590; FLH168003.01X; RZPC	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">BC053988.1</a>	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5920354, **** WARNING: chime	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">BC021242.1</a>	Homo sapiens solute carrier family 7 (cationic amino acid transport	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">BC009275.1</a>	Homo sapiens actin, beta, mRNA (cDNA clone IMAGE:3960255), **	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">AK225414.1</a>	Homo sapiens mRNA for beta actin variant, clone: HRC08987	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">XR_012665.1</a>	PREDICTED: Macaca mulatta similar to cytoplasmic beta-actin (LOC	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">DQ471327.1</a>	Homo sapiens PS1TP5-binding protein 1 (PS1TP5BP1) mRNA, compl	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">BC065493.1</a>	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6482790, **** WARNING: chime	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">BC021035.1</a>	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3834434, **** WARNING: chime	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">BT019932.1</a>	Synthetic construct Homo sapiens actin, beta mRNA, partial cds	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%
<a href="#">BC014861.1</a>	Homo sapiens actin, beta, mRNA (cDNA clone MGC:8968 IMAGE:38	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%	0.048	100%

### D)

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">XM_860691.1</a>	PREDICTED: Canis familiaris similar to exportin 1, CRM1 homolog, f	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">XM_860673.1</a>	PREDICTED: Canis familiaris similar to exportin 1, CRM1 homolog, f	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">XM_860656.1</a>	PREDICTED: Canis familiaris similar to exportin 1, CRM1 homolog, f	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">XM_860642.1</a>	PREDICTED: Canis familiaris similar to exportin 1, CRM1 homolog, f	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">XM_531839.2</a>	PREDICTED: Canis familiaris similar to exportin 1, CRM1 homolog, f	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%

### E)

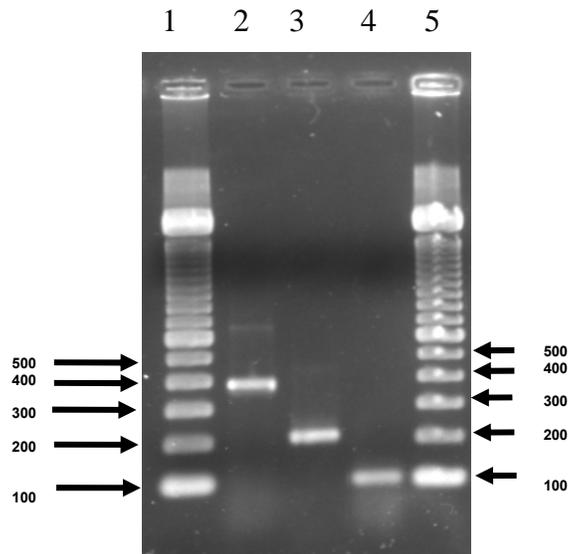
Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">AK316481.1</a>	Homo sapiens cDNA, FLJ79380 complete cds, highly similar to Expo	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">AB463037.1</a>	Synthetic construct DNA, clone: pF1KB0170, Homo sapiens XPO1 qe	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">XM_587722.4</a>	PREDICTED: Bos taurus similar to Exportin 1, CRM1 homolog (yeas	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">AK299039.1</a>	Homo sapiens cDNA FLJ55480 complete cds, highly similar to Expor	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">XM_001917503.1</a>	PREDICTED: Equus caballus similar to Exportin 1, CRM1 homolog (v	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">AK312426.1</a>	Homo sapiens cDNA, FLJ92769	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">AK289920.1</a>	Homo sapiens cDNA FLJ78427 complete cds, highly similar to Homo	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">DQ891271.2</a>	Synthetic construct clone IMAGE:100003901; FLH170613.01X; RZPC	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">XM_001161265.1</a>	PREDICTED: Pan troglodytes exportin 1, transcript variant 3 (XPO1'	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">AL833550.1</a>	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686O173 (from clone DKFZp686i	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">AF210153.1</a>	Sus scrofa nuclear export factor CRM1 mRNA, partial cds	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">Y08614.2</a>	Homo sapiens mRNA for CRM1 protein	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">D89729.1</a>	Homo sapiens mRNA for CRM1 protein, complete cds	<a href="#">58.0</a>	58.0	100%	1e-06	100%
<a href="#">XM_002571912.1</a>	Schistosoma mansoni chromosome region maintenance protein 1/e	<a href="#">52.0</a>	52.0	89%	6e-05	100%

De igual forma en el caso de los iniciadores empleados para amplificar un segmento de la  $\beta$ -Actina, el análisis con el programa Blast del NCBI, mostró una homología del 100% de los iniciadores con secuencias de *Homo sapiens* (Figura 7A, 7C). Sin embargo, aunque no se encontró evidencia de la homología de estos iniciadores con secuencias de *Canis lupus familiares*, se logró la amplificación del fragmento esperado de 394 pb (Figura 8) a partir de ARNm de células MDCK, las cuales tienen un origen canino.

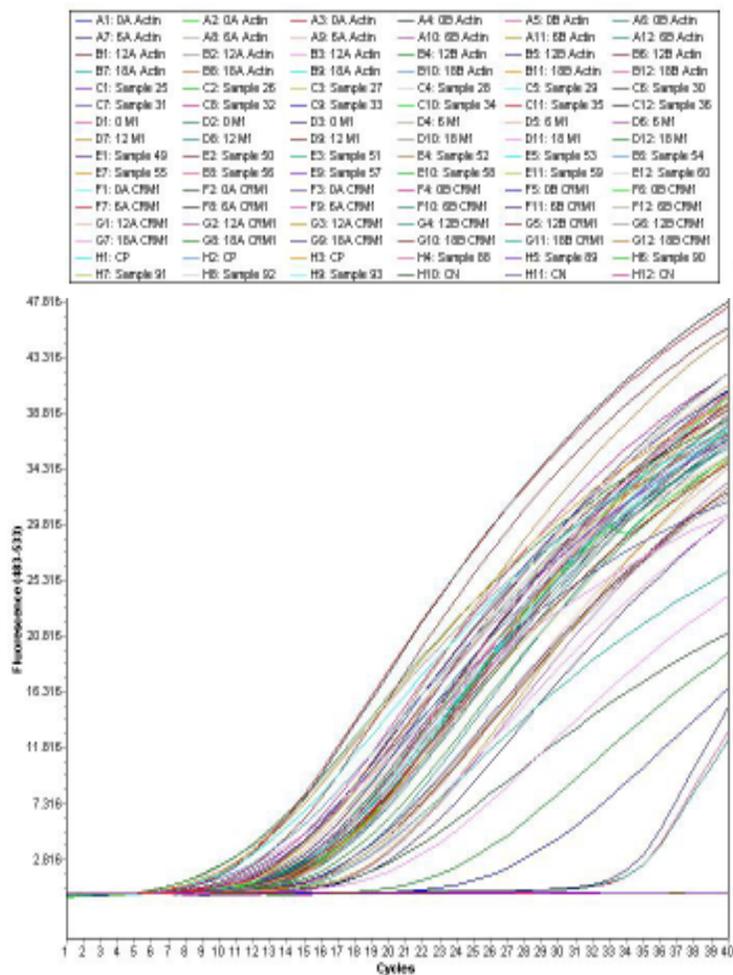
Para el caso de la CRM1, la homología fue del 100%, con *Homo sapiens* y 100% con *Canis lupus familiares* (Figura 7A, 7D y 7E), con estos iniciadores se logró la amplificación de un segmento de 99 pb (Figura 8).

Figura 8. Fotografía de un gel de agarosa al 2% en TAE, teñido con bromuro de Etidio, donde se observan los productos de amplificación por RT-PCR punto final. En el carril 1 y 5 el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, USA); en el carril 2, la banda de aproximadamente 346 pb, correspondiente al ARNm de la proteína  $\beta$ -Actina; en el carril 3, la banda correspondiente al ARNm de la proteína M1 de aproximadamente 232 pb; y por último en el carril 4, la banda correspondiente al ARNm de la proteína CRM1, correspondiente a aproximadamente 99pb



Una vez establecida la homología de cada uno de los iniciadores, se procedió a realizar la PCR en tiempo real de cada una de las botellas (dos por cada tiempo), por triplicado para cada una y realizando el análisis 3 veces, teniendo así 9 como número de muestra para cada tiempo/botella. La gráfica de amplificación de la PCR en tiempo real, muestra en el eje de las “x” el número de ciclos (Cts) donde se detecta la fluorescencia y en el eje de las “y”, las unidades de fluorescencia detectada (Figura 9). Para todos los resultados obtenidos, se realizó la prueba de análisis de varianza con una  $P(<0.05)$  para cada uno de los experimentos. En el cuadro 3, se muestran las medias y las desviaciones estándar de los Cts para cada uno de los tiempos. Con estos valores se construyeron

**Figura 9. Resultados de la amplificación por PCR en tiempo real de los tres genes, M1,  $\beta$ -Actina y CRM1. En el recuadro superior se encuentran las identificaciones para cada uno de los amplificados, identificados con la hora de cosecha (0, 6, 12 y 18), seguido por la replica (A o B) y el iniciador utilizado. La identificación de cada uno de los amplificados e por colores. En el recuadro de abajo se observan las curvas de amplificación de cada una de las muestras, incluyendo los controles positivos y negativos.**



distintas gráficas las cuales muestran el comportamiento de cada gene en distintos tiempos PI.

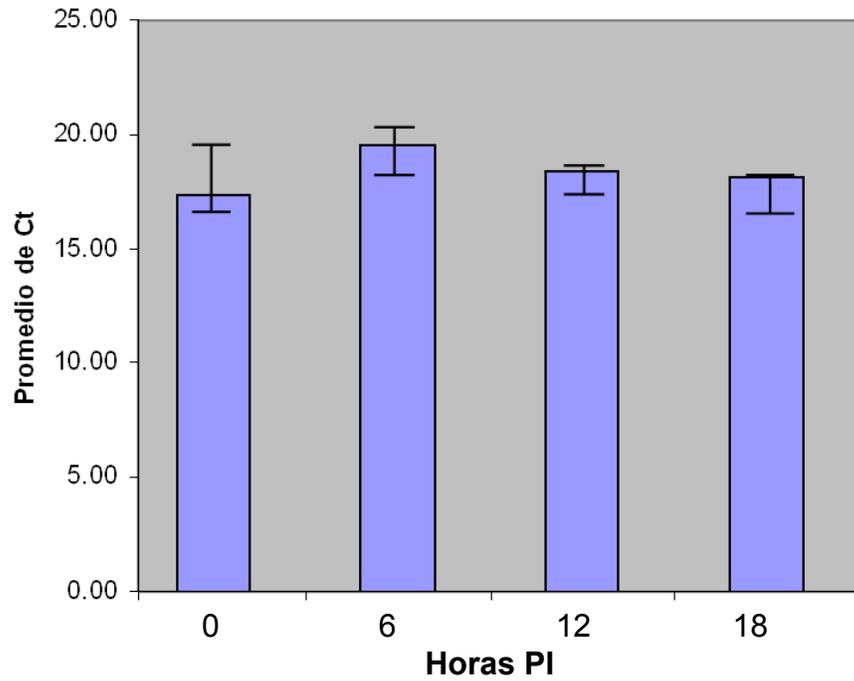
**Cuadro 3. Medias y desviaciones estándar (D.E.) calculadas a partir de los resultados de Cts de cada uno de los amplificadores de la PCR en Tiempo Real.**

Gen amplificado	Descripción	Resultados obtenidos a partir de los Cts para cada uno de los ensayos. En cada valor representa una n=9			
		0 hrs	6 hrs	12 hrs	18 hrs
PCR- tiempo real para $\beta$ -Actina	Media	17.39	19.50	18.41	18.10
	D.E.	2.99	2.01	1.35	1.45
PCR- tiempo real para CRM1	Media	15.21	17.28	16.84	17.17
	D.E.	1.58	2.40	1.20	2.52
PCR- tiempo real para M1	Media	0.00	14.99	14.18	14.78
	D.E.	0.00	0.97	0.75	1.47

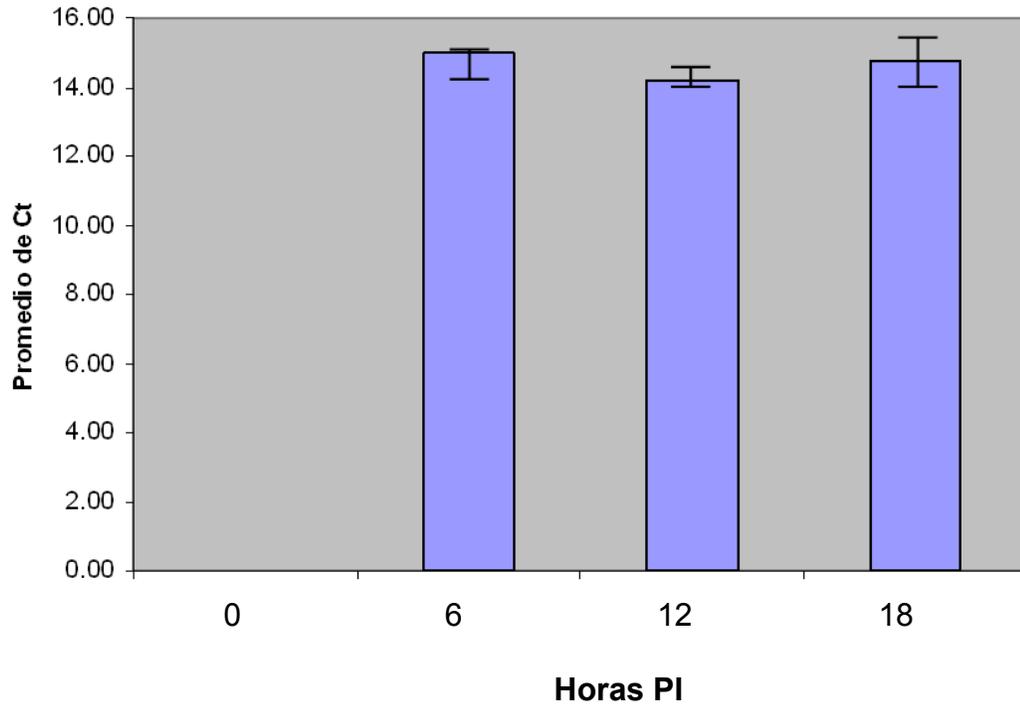
El análisis de los valores de CT para la  $\beta$ -Actina, empleada como control interno, mostró que en todos los tiempos los resultados tenían varianzas homogéneas, encontrándose evidencia estadística de la igualdad entre sus medias (Cuadro 4 NA1), lo que nos indicó que el ARN de la  $\beta$ -Actina presente en las reacciones de PCR, tenía una concentración similar, sin tener variación alguna entre los diferentes tiempos de cosecha. Aunque sus desviaciones estándar fueron variadas y las medias eran de entre 17 y 19 Cts, estos resultados no fueron significativamente diferentes. Este mismo resultado fue confirmado en dos experimentos más, cada uno con tres repeticiones (gráfica 2).

El análisis de la expresión de la proteína M1 para los tres tiempos PI, mostró Cts menores a los de la  $\beta$ -Actina, lo que indicó una mayor concentración de ARN viral en la misma muestra. Sin embargo igual que el caso anterior, los valores Cts para la M1 no fueron estadísticamente diferentes, en los distintos tiempos PI (Gráfica 3, Cuadro 4 NA2), a pesar de que en la prueba de HA realizada en los sobrenadantes de cultivo celular, se vio un aumento gradual en las UHA (Gráfica 1).

Grafica 2 donde se muestran los valores promedios de las Cts del PCR en tiempo real para la  $\beta$ -Actina con una  $n=18$  para cada barra. La barra de las 0 horas tiene un valor promedio (VP) es de 17.39, con una desviación estándar (DE) de 2.99, a las 6 horas el VP es de 19.5 y la DE de 2.01, a las 12 horas el VP es de 18.41 y la DE de 1.35 y por último a las 18 horas el VP es de 18.10 y la DE de 1.45

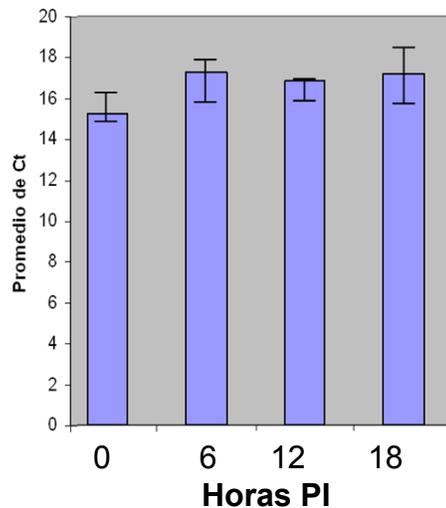


Grafica 3 donde se muestran los valores promedios de las Cts del PCR en tiempo real para la proteína M1 con una  $n=9$  para cada barra. La barra de las 6 horas tiene un valor promedio (VP) es de 14.99, con una desviación estándar (DE) de 0.97, a las 12 horas el VP es de 14.18 y la DE de 0.75 y por último a las 18 horas el VP es de 14.78 y la DE de 1.47



En lo que se refiere al análisis de expresión de la CRM1, igual que en el resultado anterior, la concentración de ARNm para esta proteína no mostró diferencias en los tiempos PI (Cuadro 4 NA3). Sin embargo para estos resultados, se encontraron desviaciones estándar más amplias, lo que nos indica que los resultados, si bien son homogéneos, existen algunos de ellos más extremos que están directamente relacionados con la amplitud de las desviaciones estándar (Gráfica 5).

Grafica 4 donde se muestran los valores promedios de las Cts del PCR en tiempo real para la proteína CRM1 con una n=18 para cada barra. La barra de las 0 horas tiene un valor promedio (VP) es de 15.21, con una desviación estándar (DE) de 1.58, a las 6 horas el VP es de 17.28 y la DE de 2.40, a las 12 horas el VP es de 16.84 y la DE de 1.2 y por último a las 18 horas el VP es de 17.17 y la DE de 2.52

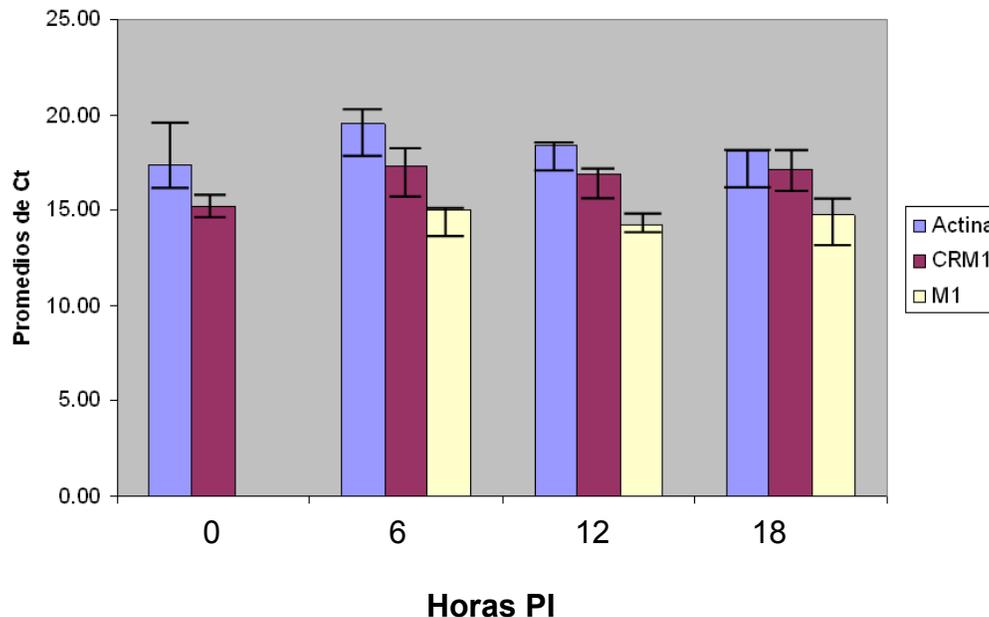


La comparación de los distintos valores de Ct's para cada amplificado (gráfica 6), mostró que el correspondiente de la M1 se encontró estadísticamente diferente al de la CRM1 y la  $\beta$ -Actina (Cuadro 4 NA 5, 6, 7). Sin embargo, su expresión en cada uno de los tres tiempos (6, 12 y 18 PI), no fue estadísticamente distinta. Las medias de los Cts de la CRM1 y la  $\beta$ -Actina, se encontraron estadísticamente iguales (Cuadro 4 NA 8, 9 y 10). Lo anterior podría interpretarse como que durante la infección se encuentra una mayor concentración de ARN del virus que el de algunos genes de expresión constitutiva de la célula.

Finalmente, en el caso de los resultados en el tiempo cero, donde la M1 no se expresa, los valores de Ct para la CRM1 se encontraron distintos

estadísticamente a los de la  $\beta$ -Actina (Cuadro 4 NA 4). Lo anterior podría indicar que en las células no infectadas, la concentración de ARN de CRM1 está en mayor concentración que el ARN de la  $\beta$ -Actina.

Grafica 5 donde se muestran los valores promedios de las Cts del PCR en tiempo real para la  $\beta$ -Actina (Azul), CRM1 (Rojo) y M1 (Amarillo), tomando los VP y los DE las gráficas 1, 2 y 3.



#### 4.5– Análisis Estadístico

En el cuadro 4 se resume el análisis de varianza, el cual fue calculado con los Cts producto de la amplificación por PCR en tiempo real de cada uno de los genes, con la finalidad de ver la variación total presente en el conjunto de datos y concluir si la variación es atribuible a la variable dependiente, que en este caso fue la infección en cultivo celular. Primero se realizaron los cálculos para verificar que los datos fueran correctos, con distribución normal y que las varianzas fueran homogéneas (Homocedasticidad), resultando en todos los conjuntos de datos que se cumplen estas dos condiciones. Para realizar al cuadro de ANDEVA, se generaron las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula: Las medias de los diferentes Cts son iguales en todos los casos
- Hipótesis Alternativa: Al menos una de las medias de los diferentes Cts es diferente en cada caso.

El estadístico de prueba usado fue la variación residual (F calculada), calculada a partir de la fuente de variación, comparada con la variación de las tablas (F de tablas) de una distribución F (Distribución Fisher-Snedecor). Finalmente, la regla de decisión fue “si la RV es mayor a la F de tablas, entonces la hipótesis nula se rechaza”.

**Cuadro 4, donde se muestran los resultados del ANDEVA realizado para los Cts resultados de el PCR en tiempo real, para comparar las diferentes medias, tomando los valores de las tiempos y sus replicas que fueron analizadas.**

Número de análisis (NA)	Resultados a comparar	Hora PI de la comparación	Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Variación residual	F de tablas
<b>1</b>	<b>ACTINA</b>	0, 6, 12, 18	Tratamiento	41.68	3	13.89	1.77	2.74
			Residual	532.31	68	7.83		
			TOTAL	573.98	71			
<b>2</b>	<b>M1</b>	6, 12, 18	Tratamiento	8.55	2	4.27	0.72	3.42
			Residual	135.96	23	5.91		
			TOTAL	144.50	25			
<b>3</b>	<b>CRM1</b>	0, 6, 12, 18	Tratamiento	109.94	3	36.65	2.67	2.74
			Residual	933.48	68	13.73		
			TOTAL	1043.42	71			
<b>4</b>	<b>ACTINA-M1-CRM1</b>	0	Tratamiento	30.67	1	30.67	4.17	4.13
			Residual	249.82	34	7.35		
			TOTAL	280.49	35			
<b>5</b>	<b>ACTINA-M1-CRM1</b>	6	Tratamiento	196.21	2	98.11	5.07	3.21
			Residual	832.57	43	19.36		
			TOTAL	1028.78	45			
<b>6</b>	<b>ACTINA-M1-CRM1</b>	12	Tratamiento	102.40	2	51.20	5.91	3.22
			Residual	363.76	42	8.66		
			TOTAL	466.16	44			
<b>7</b>	<b>ACTINA-M1-CRM1</b>	18	Tratamiento	137.54	2	68.77	4.72	3.22
			Residual	611.61	42	14.56		
			TOTAL	749.14	44			
<b>8</b>	<b>ACTINA-CRM1</b>	6	Tratamiento	12.46	1	12.46	0.74	4.13
			Residual	571.37	34	16.81		
			TOTAL	583.84	35			
<b>9</b>	<b>ACTINA-CRM1</b>	12	Tratamiento	0.14	1	0.14	0.01	4.13
			Residual	343.23	34	10.09		
			TOTAL	343.36	35			
<b>10</b>	<b>ACTINA-CRM1</b>	18	Tratamiento	4.27	1	4.27	0.46	4.13
			Residual	312.51	34	9.19		
			TOTAL	316.78	35			

## 5 - Discusión.

En células MDCK infectadas por el VIA, la maquinaria de exportación nuclear juega un papel muy importante, ya que con ella, el virus transporta las RNP del núcleo al citoplasma para posteriormente realizar el ensamblaje, primero, las RNP tienen una localización intranuclear, después del inicio de la síntesis de proteínas tardías, como la M1, la localización de la RNP comienza a ser citoplasmática y posteriormente es llevada al sitio de ensamblaje (Horimoto y col. 2004).

El objetivo principal del presente trabajo fue conocer aspectos sobre la expresión de la proteína CRM1 o Exportina de transporte nuclear en una infección por el virus de la Influenza tipo A. De tal manera, con la finalidad de observar ésta expresión, se realizaron infecciones en células MDCK a tres diferentes tiempos, se extrajo el ARN total y se realizaron ensayos de transcripción reversa y PCR en tiempo real, empleando como control normalizador al gen de la  $\beta$ -Actina.

La actina, incluyendo sus isoformas,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , son las proteínas más abundantes de células eucarióticas, desempeñando papeles dominantes en la movilidad y el mantenimiento del citoesqueleto, encontrándose prácticamente en todas las células. La  $\beta$ -actina, junto con otros genes, se expresan de manera constitutiva y debido a esto, es de uso general como control interno endógeno para normalizar la expresión de genes a estudiar (Sturzenbaum y Kille 2001).

Los resultados en la PCR en tiempo real muestran, en primer lugar, que el ARN de la  $\beta$ -Actina como gen normalizador, se encuentra en igualdad de concentración en todos los ensayos, ya que las medias de las cuatro cosechas, a las 0, 6, 12 y 18 h PI, no mostraron diferencias según el análisis de varianza  $P(<0.05)$ . En varias investigaciones, se ha reportado que la  $\beta$ -Actina cambia su expresión en diferentes condiciones y tejidos, como es la presencia de hormonas, hipoxia, suero, en cáncer, entre otras, lo que hace a este gen en algunas

ocasiones un mal candidato para ser gen normalizador (Ruan y Lai 2007). Sin embargo, en nuestros ensayos, no se utilizó droga alguna anexa al cultivo celular, y al realizar los lavados con PBS para retirar el MEM, éste y todas las soluciones se mantenían a 37°C para evitar al máximo el estrés de las células. Con estas medidas en este trabajo, se logró tener al gen de la  $\beta$ -Actina totalmente normalizado, como se observa en la gráfica 1.

El resultado de los Cts de la proteína CRM1, que refleja la concentración de ARN de la proteína fue también homogéneo, ya que con el análisis de varianza todas las medias fueron homogéneas entre sí. Sin embargo, al realizar el estadístico comparando las medias de los Cts de la  $\beta$ -Actina y de la CRM1, el resultado fue que en los tiempos 6, 12 y 18, las medias son homogéneas, caso contrario al tiempo 0 (células sin infectar), donde las medias fueron diferentes, encontrándose en mayor proporción el ARN de la CRM1. Este resultado indica que la expresión de ambos genes, no fue afectada en el transcurso de la infección, teniendo la misma concentración de ARN, pues en los tiempos 6, 12 y 18 h PI, se mantuvieron constantes, sin embargo, en las células no infectadas, se expresó más la CRM1.

Si bien existen varios casos de virus que necesitan de la proteína CRM1 para la infección, como por ejemplo: el virus Epstein-Barr que en su proteína EB2 tiene la NES de unión CRM1 (Hiriart y col. 2003); varios retrovirus como el Virus de Inmunodeficiencia Humana (Okada 2009) o el retrovirus Jaagsiekte de las ovejas (Nitta y col 2009); el virus Sincitial Respiratorio que en su proteína de matriz, también contiene el sitio de unión a la CRM1 (Ghildyal y col 2009); o como la proteína NS5 del virus del dengue (Flavivirus), cuya exportación depende de la CRM1 (Rawlinson y col.2009); el Herpes virus simple 1, que necesita el transporte vía CRM1 para su infección. En todos éstos casos se realizaron ensayos de infección, colocando un inhibidor del CRM1, la leptomicina B, resultando en la localización nuclear de las proteínas dependientes de esta vía, ya que la exportación nuclear se ve bloqueado. Sin embargo, en ninguno de ellos se midió

la expresión de CRM1 en las células infectadas. Por otro lado, en varios tipos de cáncer se tienen reportes de la sobre expresión de la CRM1, ya que ésta proteína, participa en la exportación nuclear de proteínas tumorales (Turner y Sullivan 2008).

Finalmente, el análisis de varianza realizado con los valores de Ct para la expresión de la proteína M1, mostraron que su expresión se encontraba por arriba de la  $\beta$ -Actina y CRM1, es decir, la cantidad de ARNm para esta proteína fue mayor que para la proteína  $\beta$ -Actina y CRM1, en los tres tiempos PI, 6, 12 y 18 h. Éstos resultados sugieren entonces que la producción de la proteína M1 en células infectadas se inicia aproximadamente a las 3 h. PI. En nuestros ensayos a las 6 h. la célula había iniciado la producción de viriones maduros, lo cual implicaba entonces que la M1 debía haber sido sintetizada mucho antes, estos valores coinciden con lo reportado por Sidorenko y Reichl (2004). De igual forma, en nuestros ensayos, la producción elevada de M1 se continuó hasta las 18 horas, tiempo en el cual a pesar de haber una producción de viriones las células en monoestrato conservaban su confluencia. Lo que sugiere entonces, que la proteína M1 mantiene su expresión a lo largo de todo el ciclo viral. Esta situación ya había sido reportada en infecciones de células MDCK con el VIA, en estos ensayos la proteína M1 fue localizada de manera constante, tanto en el núcleo como el citoplasma, hasta las 90 h PI (Martin y Helenius 1991), coincidiendo con los resultados observados en este trabajo. Incluso sugerimos además, que la proteína M1 no es degradada fácilmente en la célula y como se están produciendo viriones y son liberados al medio, la célula sigue produciendo de manera constante esta proteína, si bien en este trabajo no se comprobó la degradación de la proteína, la expresión por arriba de genes constitutivos de la célula ayudarían a explicar la presencia constante y abundante de la proteína M1 vista por Martin y Helenius (1991).

Cabe aclarar finalmente, que en la cinética de infección del VIA en células MDCK establecida en este trabajo, se buscó establecer un aumento de la

producción de viriones sin daño significativo al monoestrato, con la intención de recuperar los mensajeros celulares y virales. Los resultados mostraron un incremento significativo de viriones, pues de 0 UHA a las 6 h PI subió a 64 HUA a las 18 h PI. Si bien las UHA no miden la capacidad de los viriones producidos para infectar células, si nos dan un indicio de aumento en las partículas virales, que para el caso del VIA están directamente relacionadas con la M1 ya que esta proteína es indispensable para el ensamblaje viral.

### **5.1 – Conclusión.**

Con los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que en la infección viral, la proteína M1 que es la más abundante en la partícula viral, se expresa de manera constante y en periodos muy tempranos en la infección, esto con el fin de poder realizar las diferentes funciones, como lo es la exportación nuclear de las RNP, su transporte a través del citoplasma y la acumulación de ésta en el sitio de ensamble. Si bien, la exportación de la RNP depende de la proteína CRM1, en estos ensayos, no se vio afectada su expresión ya que la cantidad de ARN presente, se mantuvo constante, indicando que la expresión de este gen es suficiente para satisfacer el flujo de proteínas del VIA.

## 6 - Bibliografía.

- Akarsu H, Burmeister, Petosa C, Petit I, Müller CW, Ruigrok RWH, Baudin F. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J.* 2003; 22:4646–4655.
- Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, Suprpto A, Karni-Schmidt O, Williams R, Chait BT, Sali A, Rout MP. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 2007; 450:695–701.
- Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP. Influenza Virus Assembly: Effect of Influenza Virus Glycoproteins on the Membrane Association of M1 Protein. *J. VIROLOGY.* 2000; 74:8709-8719.
- Amorim MJ, Read, Dalton RM, Medcalf L, Digard P. Nuclear Export of Influenza A Virus mRNAs Requires Ongoing RNA Polymerase II Activity. *Traffic* 2007; 8:1–11
- Anwar T, Lal SK, Khan AU. Matrix protein 1: A comparative in silico study on different strains of influenza A H5N1 Virus. *Bioinformation* 2006; 1:253-256.
- Babcock HP, Chen C, Zhuang X. Using Single-Particle Tracking to Study Nuclear Trafficking of Viral Genes. *Biophysical J.* 2004; 87:2749–2758.
- Baigent SJ, McCauley JW. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *Bio Essays* 2003; 25: 657-561.
- Baudin F, Petit I, Weissenhorn W, Ruigrok RWH. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology* 2001; 281:102–108.
- Bischoff J, Domrachev M, Federen S, Otón C, Leipe D, Soussov V, Sternberg R, Turner S. Taxonomy Browser of National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine. [Serial online] May 9, 2008. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>
- Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RWH, Baudin F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Research.* 2007; 124:12–21
- Bui M, Wills EG, Helenius A, Whittaker GR. Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J. Virol* 2000; 74:1781–1786.
- Capelson M, Hetzer MW . The role of nuclear pores in gene regulation, development and disease. *EMBO reports* 2009; 10(7):697-705
- Cassetti MC, Noah DL, Montelione GT, Krug RM. Efficient Translation of mRNAs in Influenza A Virus-Infected Cells Is Independent of the Viral 5' Untranslated Region. *Virology* 2001; 289:180-185.

- Chen Z, Krug RM. Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. *Trends Microbiology* 2000; 8(8):376-383.
- Chen Z, Li Y, Krug RM. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *The EMBO J.* 1999; 18:2273–2283.
- Cros JF, García-Sastre A, Palese P. An Unconventional NLS is Critical for the Nuclear Import of the Influenza A Virus Nucleoprotein and Ribonucleoprotein. *Traffic* 2005; 6: 205–213.
- Cullen BR . Nuclear RNA Export Pathways. *Mol. Cellular Biology* 2000; 20(12):4181–4187
- D'angelo Ma, Hetzer MW. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol* 2008; 18: 456–466.
- D'Angelo MA, Martin WH. Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends in Cell Biology* 2008; 18(10):456-466
- Elton D, Simpson-Holley M, Archer K, Medcalf L, Hallam R, McCauley J, Digard P. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J. Virol* 2001; 75:408–419.
- Englmeier L, Fornerod M, Bischoff FR, Petosa C, Mattaj IW, Kutay, U.Englmeier. RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. *EMBO Rep* 2001; 2:926–932
- Erkmann JA, Kutay U. Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp. Cell Res* 2004; 296:12– 20.
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj LW. CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals. *Cell* 1997; 90:1051–1060.
- Fraire ChM y Paz RP. (1996) Aislamiento en México del Virus de Influenza Aviar. *Memorias del XX Congreso Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA)*. 1995. Acapulco, México.
- García GJ y Mendez OM, (1996) Estudio Sobre Algunas Características de los Virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad Aislados en México, de Enero a Septiembre de 1994. *Memorias del XXI Congreso Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA)*. 1996. Cancún, México.
- Gay GM, Soto PE y Merino BJ. (1994) Primer Aislamiento e Identificación en México del Virus de Influenza Aviar. *Nuestro Acontecer Avícola*. 2:42-50.
- Ghildyal R, Ho A, Dias M, Soegiyono L, Bardin PG, Tran KC, Teng MN, Jans DA. The respiratory syncytial virus matrix protein possesses a Crm1-mediated nuclear export mechanism. *J Virol* 2009; 83(11):5353-62.

- Gómez-Puertas P, Mena I, Castillo M, Vivo A, Pérez-Pastrana E, Portela A. Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins. *J. Gen. Virology* 1999; 80: 1635–1645.
- Hara K, Schmidt F, Crow M, Brownlee G. Amino Acid Residues in the N-Terminal Region of the PA Subunit of Influenza Virus RNA Polimerasa Play a Critical Role on Protein Stability, Endonuclease Activity, Cap Binding, and Virion RNA promoter Bonding. *J. Virol* 2006; 80:7789-7798
- Hara K, Shiota M, Kido H, Ohtsu Y, Kashiwagi T, Iwahashi J, Hamada N, Mizo K, Tsumura N, Kato H, Toyoda T. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes to Cells* 2001; 6:8797.
- Hiriart E, Farjot G, Gruffat H, Nguyen MV, Sergeant A, Manet E. A novel nuclear export signal and a REF interaction domain both promote mRNA export by the Epstein-Barr virus EB2 protein. *J. Biol. Chem* 2003; 278:335–342.
- Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y, Webster RG. Origin and Molecular Changes Associated with Emergent of a Highly Pathogenic H5N2 Influenza Virus in Mexico. *Virology* 1995; 213:223-230.
- Horimoto T y Kawaoka Y. Pandemic Threat posed by Avian Influenza A viruses. *Clin. Microbiol. Reviews* 2001;14:129-149.
- Horimoto KI, Horimoto T, Fujii Y, Kawaoka Y. Generation of Influenza A Virus NS2 (NEP) Mutants with an Altered Nuclear Export Signal Sequence. *J. Virology* 2004; 78(18):10149–10155.
- Ilyinskii PO, Meriinb AB, Gabaib VL, Zhirnovc OP, Thoidisa G, Shneidera AM. Prime-boost vaccination with a combination of proteosome-degradable and wild-type forms of two influenza proteins leads to augmented CTL response. *Vaccine* 2008; 26:2177—2185.
- Ishihama A. A Multi-functional Enzyme whit RNA Polimerase and RNase Activities: Molecular Anatomy of Influenza Virus RNA Polymerse. *Biochemie* 1996; 78:1097-1102.
- Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y. Molecular Basis For The Generation In Pigs Of Influenza A Viruses With Pandemic Potential. *J. Virology* 1998; 72: 7367-7373
- Kutay U, Güttinger S. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *TRENDS in Cell Biology* 2005; 15(3):121-123.
- Lakadamyali M, Rust M, Zhuang X. Endosytosis of Influenza Viruses. *Microbes and Infection* 2004; 6:929-396.
- Lanzrein M, Schlegel A and Kempf C. Entry and Uncoating of enveloped viruses. *Biochem. J.* 1994; 302:313-320.

- Lone Simonsen. The global impact of influenza on morbidity and mortality. *Vaccine* 1999; 17: S3-S10
- López CH, Rivera CE y Irastorza EM. (1996) Situación y Perspectiva del Programa de Erradicación de la Influenza Aviar en México. Memorias del XXI Congreso Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA). 1996. Cancún, México.
- Mahy BW, Collier L. (1998) *Microbiology and Microbial Infections: Virology*. 9nd ed. Gran Bretaña. Arnold.
- Maldonado CE, Verdugo RA, Montero RAB y Oropeza NR (2009). Estandarización de un Método de Diagnóstico Molecular para la Necrosis Pancreática Infecciosa en Salmonidos Utilizando Controles Internos. (Tesis de Maestría). México (D.F.) México: Fac. Med. Vet. Zoo. Universidad nacional Autónoma de México, 2009.
- Martin, K., A. Helenius. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 1991b; 67:117–130.
- Martin, K., A. Helenius. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J. Virol* 1991a; 65:232–244.
- McCauley J and Mahy B. Structure and function of the influenza virus genome. *Biochem. J.* 1983; 211:281-294.
- McCown MF, Andrew Pekosz A. Distinct Domains of the Influenza A Virus M2 Protein Cytoplasmic Tail Mediate Binding to the M1 Protein and Facilitate Infectious Virus Production. *J. VIROLOGY* 2006; 80: 8178–8189.
- Moroianu J. Distinct Nuclear Import and Export Pathways Mediated by Members of the Karyopherin b Family. *J. Cel Biochem* 1998; 70:231–239.
- Mosammaparast N, Pemberton LF. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *TRENDS in Cell Biology* 2004; 14(10):547-555.
- Nayak D, Hui E K, Barman S. Assembly and Budding of Influenza Virus. *Virus Res* 2004; 106:147-165.
- Neumann G, Castrucci MR, Kawaoka Y. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol* 1997; 71:9690-9700.
- Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y. Influenza A virus NEP proteína mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J*, 2000; 19:6751–6786.
- Nitta T, Hofacre A, Hull S, Fan H. Identification and mutational analysis of a Rej response element in Jaagsiekte sheep retrovirus RNA. *J Virol* 2009; 83(23):12499-511.
- NOM-044-ZOO-1995. Campaña Nacional Contra La Influenza Aviar. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de Agosto de 1996, Modificación: 17 de Noviembre de 1998.

- O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroianu J. Nuclear import of influenza-virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J. Biol Chem* 1995; 270:22701–22704.
- O'Neill RE, Talon J, Palese P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* 1998; 17:288–296.
- OIE (World Organization For Animal Health) 2000. Ficha técnica de Influenza Aviar. [Serial online] Marzo De 2007. Available from: URL: [www.oie.int/eng/avian\\_influenza/E\\_Fiches\\_IA.pdf](http://www.oie.int/eng/avian_influenza/E_Fiches_IA.pdf)
- OIE (World Organization For Animal Health) 2005, Food And Agriculture Organisation Conferencia Científica Internacional OIE/FAO Sobre La Influenza Aviar, OIE París, Francia.
- OIE (World Organization For Animal Health) Actualización Sobre La Influenza Aviar En Animales (Tipo H5). [Serial online] 09 De Enero 2009. Available from: URL: [http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/E\\_AI-Asia.htm](http://www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/E_AI-Asia.htm)
- Okada H, Zhang X, Fofana IV, Nagai M, Suzuki H, Ohashi T, Shida H. Synergistic effect of human CycT1 and CRM1 on HIV-1 propagation in rat T cells and macrophages. *Retrovirology* 2009;6:43.
- Parrish CR, Kawaoka Y. The Origins of New Pandemic Viruses: The Acquisition of New Host Ranges by Canine Parvovirus and Influenza A Viruses. *Annu. Rev. Microbio* 2005; 59:553–586.
- Portela A, Digard P. The Influenza Virus Nucleoprotein: A Multifunctional RNA-Binding Protein Pivotal To Virus Replication. *J. Gen. Virol* 2002; 83:723-734
- Rawlinson SM, Pryor MJ, Wright PJ, Jans DA. CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production. *J Biol Chem* 2009; 5;284(23):15589-97.
- Ribbeck K, Gorlich D. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* 2001; 20:1320–1330.
- Ruan W, Lai M. Actin, a reliable marker of internal control?. *Clinica Chimica Acta.* 2007; 385:1–5
- Saif M, Barnes HJ. (2003) *Diseases of poultry*. 11th ed. Ames, Iowa : Iowa State University.
- Satterly N, Tsai PL, Deursen JV, Nussenzweig DR, Wang Y, Faria PA, Levay A, Levy DE Y Fontoura BMA. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104(6):1853–1858.
- Sha B. and Luo M. Structure of a Bifunctional Membrane-RNA Binding Protein, Influenza Virus Matrix Protein M1. *Nat. Struc. Biol* 1997; 4:239-244.

- Shaw M, Arden N, Maassab H. New Aspects of Influenza Viruses. *Clin. Microbiol. Rev* 1992; 5 :74-925.
- Shoham D. Review: Molecular evolution and the feasibility of an avian influenza virus becoming a pandemic strain—a conceptual shift. *Virus Genes* 2006; 33:127–132.
- Sidorenko Y, Reichl U. Structured Model of Influenza Virus Replication in MDCK Cells, *Biotech. And Bioeng* 2004; 88:1-14.
- Skehel J., Wiley C. Receptor Binding and Membrane Fision in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem* 2000; 69:531-569.
- Steinhauer D. Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus. *Virology* 1999; 258:1-20.
- Sturzenbaum SR, Kille P. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 2001; 130:281–9.
- Turner JG y Sullivan DM. CRM1-Mediated Nuclear Export of Proteins and Drug Resistance in Cancer. *C. Medicinal Chemistry* 2008; 15(26):2648-2655
- Wang P, Palese P, O'Neill RE. The NPI-1/NPI-3 (karyopherin  $\alpha$ ) binding site on the influenza A virus nucleoprotein is a nonconventional nuclear localization signal. *J. Virol.* 1997; 71:1850–56.
- Wang P, Palese P, O'Neill RE. The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza a virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol.* 1997; 71:1850-1856.
- Wang W, Cui Z-Q, Han H, Zhang ZP, Wei HP, Zhou YF, Chen Z Y Zhang XE. Imaging and characterizing influenza A virus mRNA transport in living cells. *Nucleic Acids Research* 2008; 36(15):4913–4928
- Watanabe K, Takizawa N, Katoh M, Hoshida K, Kobayashi N, Nagata K. Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus Res* 2001; 77:31–42.
- Weber F, Kochs G, Gruber S, Haller O. A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins. *Virology* 1998; 250:9-18.
- Webster R, Bean W, Gorman O, Chambers T Y Kawaoka Y. Evolution And Ecology Of Influenza A Viruses. *Microbiological Reviews* 1992; 56(1):152-179.
- Whittaker G, Bui M, Helenius A. Nuclear Trafficking of Influenza Virus Ribonucleoproteins in Heterokaryons. *J. Virology* 1996; 70(5): 2743-2756.
- Whittaker G, Kann M, Helenius A. Viral entry into the nucleus, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 2000; 16:627–651.

- Wu WWH, Panté N. The directionality of the nuclear transport of the influenza A genome is driven by selective exposure of nuclear localization sequences on nucleoprotein. *Virology J.* 2009; 6:68
- Wu WWH, Sun YHB, Panté N. Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. *Virology J.* 2007; 4:49.
- Zemp I, Kutay U. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Letters* 2007; 581:2783-2793.