



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

"CAMBIOS EN EL CITOESQUELETO DE VIMENTINA EN CÉLULAS
MARC-145 DURANTE LA INFECCIÓN *in vitro* CON EL VIRUS DE
PRRS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

SARAI GUERRERO LÓPEZ

ASESORES: Dra. Samantha Jardon Xicotencatl

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2023.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



UNAM
CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Cambios en el citoesqueleto de vimentina en células MARC-145 durante la infección in vitro con el virus de PRRS

Que presenta la pasante: **Sarai Guerrero López.**

Con número de cuenta: **416030721** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de marzo de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Misael Rúben Oliver González	
VOCAL	Dr. Carlos Ignacio Soto Zarate	
SECRETARIO	Dra. Samantha Jardón Xicotencatl	
1er. SUPLENTE	Dr. Alejandro Vargas Ruiz	
2do. SUPLENTE	Dra. Yasmín Guadalupe De Loera Ortega	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/ntm*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio 4 “Morfología Veterinaria y Biología Celular” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) en Campo 4.

Agradecimientos a los proyectos CI2267, PIAPIME 2.11.10.23 y 2.11.13.22 por los recursos brindados para la realización de este proyecto de investigación.

A mis asesores por sus conocimientos, apoyo y paciencia que me brindaron a lo largo de esta investigación.

Mamá, sin ti jamás hubiera creído en lo inteligente y capaz que soy para lograr todo lo que me propongo. Eres mi inspiración diaria y la cobija de mis días fríos. Nunca acabaré de agradecerte todo lo que has hecho por mí. Recuerda que mis logros también son tuyos. Te amo.

A mis abuelos porque más que eso ustedes han sido mis padres a lo largo de mi vida, gracias por apoyarme, aconsejarme y cuidarme durante todos estos años. Mucho de lo que yo soy es gracias a ustedes. Son la cura de mi corazón.

A Niebla, Yoda, Dala y Nymeria por acompañarme en mis desvelos, ser ese rayo de luz que siempre acompaña mi vida y ser la motivación diaria para levantarme de mis caídas.

Mario, gracias por llegar y llenar cada hueco que había dentro de mí. Ahora somos tú y yo.

Pero sobre todo gracias a ti, Sarai, nunca olvides que no estás sola, siempre te tienes a ti misma. Haz lo que realmente te haga feliz, vive cada minuto de tu vida y no tengas miedo en empezar de nuevo, no vas a empezar de cero, esta vez iniciarás con experiencia.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
I. INTRODUCCIÓN	11
Antecedentes generales:	
1.1 Producción porcina en México	11
1.2 Enfermedades virales	11
1.3 PRRSv	12
1.4 Cuadro clínico en las distintas etapas productivas del cerdo	13
1.5 Diagnóstico	15
1.6 Prevención y tratamiento	16
1.7 Impacto negativo del PRRS en el sector pecuario	17
Antecedentes particulares:	
1.8 Cultivos celulares	18
1.9 Células MARC-145	19
1.10 Citoesqueleto	19
1.10.1 Filamentos de actina	20
1.10.2 Microtúbulos	21
1.10.3 Filamentos intermedios	22
1.10.3.1 Vimentina	23
1.11 Citoesqueleto y virus	24
II. JUSTIFICACIÓN	25
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVOS	25
Objetivo general	25
Objetivos particulares	25

V. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1 Cultivo celular	26
5.1.1 Línea MARC-145	26
5.1.2 Tripsinización y Pase celular	26
5.1.3 Sembrado en cubreobjetos	27
5.1.4 Protocolo de infección viral <i>in vitro</i>	28
5.2 Técnica de inmunofluorescencia	28
5.2.1 Microscopio de fluorescencia	29
5.3 Procesamiento y análisis de imágenes	29
5.3.1 Software Image J	29
VI. RESULTADOS	31
VII. DISCUSIÓN	39
VII. CONCLUSIONES	42
IX. REFERENCIAS	43
X. ANEXOS	47

A S E S O R E S D E T E S I S

Dra. Samantha Jardon Xicotencatl

Laboratorio 4 “Biología celular y Morfología Veterinaria”.

Unidad de Investigación Multidisciplinaria.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

Laboratorio 4 “Biología celular y Morfología Veterinaria”.

Unidad de Investigación Multidisciplinaria.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4.

Universidad Nacional Autónoma de México.

RESUMEN

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es una enfermedad altamente infecciosa de distribución mundial que genera un considerable impacto negativo económico y productivo en la porcicultura mexicana. El uso de vacunas reduce la diseminación del virus, aunque existen reportes que contradicen la seguridad y eficacia de éstas. La transmisión del virus depende de la función citoesquelética de las células y se cree que la vimentina participa en la replicación y transporte del virus. Es por eso que el objetivo de este trabajo fue estudiar la morfología del citoesqueleto de vimentina en células MARC-145 infectadas con el virus PRRS, en baja y alta confluencia, para la obtención de un modelo celular morfológico que permitiera la identificación de cambios inducidos por la infección *in vitro*. Se empleó la línea celular MARC-145 para el cultivo y propagación del virus proveniente de una vacuna comercial y se utilizó una técnica de inmunofluorescencia, bajo condiciones experimentales específicas, para su posterior digitalización mediante un microscopio de fluorescencia y procesamiento con el Software Image J. Los resultados mostraron patrones alterados en la expresión de vimentina en la zona perinuclear y la formación de sincitios en conglomerados de la misma proteína a partir de las 24 horas posinfección (hpi), concluyendo con la destrucción total de la monocapa a las 72 hpi, esto puede corresponder a una despolimerización citoplasmática provocando una reorganización de la vimentina por lo que su capacidad de infectividad viral podría ser dependiente de la manipulación del citoesqueleto, de manera que es importante establecer un modelo morfológico de este elemento para el estudio de PRRSv.

Palabras clave: vimentina, citoesqueleto, MARC-145, PRRS, cultivo celular.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
h	Horas
hpi	Horas pos-infección
min	minutos
PRRS	Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino
PRRSv	Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero Fetal Bovino
TA	Temperatura ambiente
UI	Unidad Internacional
µg	Microgramo

ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS Y ANEXOS

FIGURAS

Figura 1. Estructura del PRRSv.	13
Figura 2. Generalidades en la patogenia de PRRSv.	15
Figura 3. Situación de la enfermedad PRRS en México.	18
Figura 4. Estructuras de orden superior de actina.	21
Figura 5. Equipos empleados en el proceso de cultivo celular.	26
Figura 6. Campana de flujo laminar. Cuarto de cultivo L4-UIM FES-C.	27
Figura 7. Vacuna empleada en el proceso de cultivo celular.	28
Figura 8. Material utilizado en la técnica de inmunofluorescencia.	29
Figura 9. Fotomicrografías de fluorescencia en células MARC-145.	31
Figura 10. Cultivos de la línea celular MARC-145 control.	32
Figura 11. Agregados perinucleares MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi.	33
Figura 12. Células gigantes MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi.	34
Figura 13. Filopodios MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi.	35
Figura 14. Sincitios MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi.	36
Figura 15. Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS.	37
Figura 16. Línea celular MARC-145 a las 72 hpi con el virus PRRS.	38

CUADROS

Cuadro 1. Vacunas comercializadas en México contra PRRSv.	16
Cuadro 2. Características de línea celular MARC-145.	19
Cuadro 3. Proteínas relacionadas con la vimentina.	24

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medios de cultivo.	47
Anexo 2. Estandarización de las concentraciones de trabajo de anticuerpos.	47
Anexo 3. Ficha técnica de anticuerpo primario.	48
Anexo 4. Ficha técnica de anticuerpo secundario.	49
Anexo 5. Detalles de figuras.	50

I. INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES GENERALES

1.1 Producción porcina en México

En 2020 México alcanzó una producción de 1,652,362 toneladas de carne porcina colocándolo como el decimotercer productor mundial según las cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Debido a la demanda nacional e internacional la carne de puerco ha tenido un incremento en los últimos 10 años; su consumo anual per cápita es de 17.9 kg. El mercado de carne porcina se distribuye en mercados ambulantes y supermercados en diferentes presentaciones de cortes y embutidos (*SIAP, 2021*). En México existen cerca de un millón de unidades de producción que se dividen en tecnificadas, semi-tecnificadas y familiares o de traspatio. No obstante, la falta de garantía en los precios y el crecimiento acelerado de costos conllevan a una inestabilidad del mercado porcino por lo que la presencia de enfermedades dentro del país genera un impacto económico negativo (*González, 2019*).

1.2 Enfermedades virales

Se podría pensar que los estudios sobre la virología veterinaria comenzaron recientemente, pero descubrimientos de épocas anteriores tales como el de Loeffler y Frosch con la enfermedad de Fiebre Aftosa dio paso a que se definieran muchas enfermedades agudas en animales, como otras infecciones virales. Tal es el caso de la Peste Equina Africana, Peste Aviar, Rabia, Moquillo canino, Anemia Infecciosa Equina, Peste Bovina y Fiebre Porcina Clásica. A partir del siglo XX y con el avance en tecnologías se generaron métodos y técnicas en el laboratorio, como el desarrollo de cultivos celulares, medios artificiales o secuenciaciones de ADN, que se han convertido en una columna vertebral esencial para la investigación biomédica y que nos han proporcionado herramientas para la comprensión del proceso de enfermedad (*MacLachlan, 2017*).

El desplazamiento poblacional provoca una mayor urbanización aumentando la demanda de alimento por lo que el número de animales utilizados para el consumo humano incrementa para satisfacer estas necesidades. Las prácticas agrícolas y ganaderas se vuelven intensivas

y se necesitan mayores espacios de tierra para la producción, lo que conduce a una invasión, alteración y desplazamiento de especies de vida silvestre, propiciando la propagación de enfermedades virales. El comercio junto con las exportaciones e importaciones también han desempeñado un papel importante en la aparición y propagación de virus, además la domesticación de animales se ha considerado uno de los principales impulsores de la aparición de enfermedades infecciosas zoonóticas (*Johnson, 2014*).

En México se reportan pérdidas económicas anuales por más de 20 millones de dólares asociadas a enfermedades virales en cerdos, siendo la Influenza Porcina (IP), Circovirus Porcina (PCV), la Diarrea Epidémica Porcina (DEP) y el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), las de mayor impacto económico negativo y productivo para la porcicultura, por lo que en la práctica veterinaria actual es tan importante su estudio por el bien de las unidades de producción pecuaria (*Castro, 2020*).

1.3 PRRS virus

PRRS, síndrome respiratorio y reproductivo por sus siglas en inglés, es una enfermedad porcina altamente infecciosa de distribución mundial perteneciente al género *Betaarterivirus*, de la familia *Arteriviridae* en el orden *Nidovirales* (*Jackson, 2007*). Afecta a las especies *Sus scrofa*, *Sus scrofa doméstica* y *Pecari tajacu*. En la actualidad se reconocen dos especies importantes siendo *Betaarterivirus suid 1* predominante en Europa y *Betaarterivirus suid 2* predominante en América y Asia (*ICTV, 2023; Zimmerman, 2019*).

Es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo, pequeño, posee una nucleocápside proteica además de una envoltura de origen membranario. Es estable en un pH de entre 6 - 7.5 y crece en suero, tejidos linfoides y pulmonares homogeneizados y cultivos celulares especialmente en la línea celular MARC-145. Su organización genómica está organizada en aproximadamente 11 marcos de lectura abiertos: ORF (open reading frame, por sus siglas en inglés) de los cuales dos son de prioridad; ORF5 y ORF7 que son esenciales para la replicación viral (*Zimmerman, 2019*).

Las dos principales proteínas de envoltura son la M, una proteína de envoltura de matriz no glicosilada que se acumula en el retículo endoplásmico, y la GP5, que es la más expuesta del virus. Juntas forman heterodímeros unidos por disulfuro que conforman la envoltura del virión sobre la que se anclan pequeñas cantidades del resto de proteínas de superficie (Fig.1) (Prieto, 2017; Zimmerman, 2019).

Otras glucoproteínas presentes son la GP2a, GP3 y GP4 que se requieren para la incorporación en el virión y para la infectividad viral. Juntas forman una estructura trimérica que puede o no interactuar con GP5 para la mediación de la infección y es clave para la entrada del virus en la célula diana. La proteína N es la proteína estructural más abundante que constituye la nucleocápside, se expresa en niveles elevados en las células infectadas e interactúa con el ARN viral en el ensamblaje de partículas infecciosas. Por su abundante expresión técnicas de diagnóstico serológico, fundamentalmente ELISA, detectan anticuerpos frente a esta proteína (Prieto, 2017; Zimmerman, 2019).

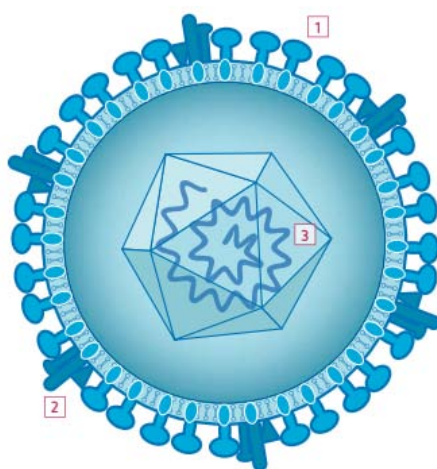


Figura 1. Estructura del PRRSv. 1-Proteínas GP5 y M, 2-Proteínas GP2a, GP3 y GP4, 3-Proteína N. (Tomado de Prieto, 2017).

1.4 Cuadro clínico en las distintas etapas productivas del cerdo

Los animales infectados excretan el virus en las secreciones orales y nasales, orina, semen y ocasionalmente heces y los cerdos son susceptibles al virus por las vías intranasal, oral y vaginal teniendo contacto con otros individuos infectados y vertical de madres infectadas a fetos (transplacentaria) (Fig.2) (Prieto, 2017; Zimmerman, 2019).

La entrada del virus es intranasal mayormente y se replica en un subconjunto de células derivadas de monocitos que muestran CD163, receptor celular necesario para la unión, internalización y replicación del virus, posteriormente se propaga a macrófagos alveolares e intravasculares pulmonares, macrófagos derivados de monocitos en tejidos linfoides y en menor grado en células dendríticas, a través de un mecanismo de endocitosis mediado por receptores, que estimulan la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- alfa, IL - 1 e IL - 6) y promueven la entrada y activación de leucocitos, provocando un aumento de la permeabilidad vascular (edema pulmonar), neumonía intersticial e inducción de efectos sistémicos como pirexia, anorexia y letargo, estas alteraciones retrasan la producción de anticuerpos neutralizantes (*Ding, 2012; Prieto, 2017; Zimmerman, 2019*).

En verracos y cerdas puede provocar fallas reproductivas. Los verracos infectados carecen de libido y presentan cambios en los espermatozoides como motilidad reducida y defectos acrosómicos por lo que la diseminación viral en el semen puede generar en una transmisión a las cerdas a través del endometrio. En cerdas gestantes el virus cruza la interfaz materno-fetal para infectar fetos replicándose en timo fetal, tonsilas y linfonodos que producen daños estructurales en la placenta provocando retorno al estro, abortos en el último tercio de la gestación y ocasionalmente en el segundo además de camadas compuestas por una combinación de cerdos normales, débiles y muertos que pueden o no estar momificados. Asimismo la replicación del virus en los macrófagos del endometrio puede causar la muerte indirecta de células maternas y fetales provocando la muerte fetal neutralizantes (*Ding, 2012; Prieto, 2017; Zimmerman, 2019*).

Los cerdos lactantes presentan diarrea neonatal severa mientras que los destetados pueden mostrar signos de fiebre alta por medio de temblores, coloración morada en las orejas (cianosis) y articulaciones inflamadas. Por último los cerdos en crecimiento presentan principalmente tos, estornudos, fiebre y secreciones oculares. En cuadros respiratorios complicados se observa taquipnea, disnea y otros signos no específicos como anorexia, letargo, pelaje áspero, reducción variable de la ganancia diaria de peso, así como un porcentaje de mortalidad de entre 12-20% (*Ding, 2012; Prieto, 2017; Zimmerman, 2019*).

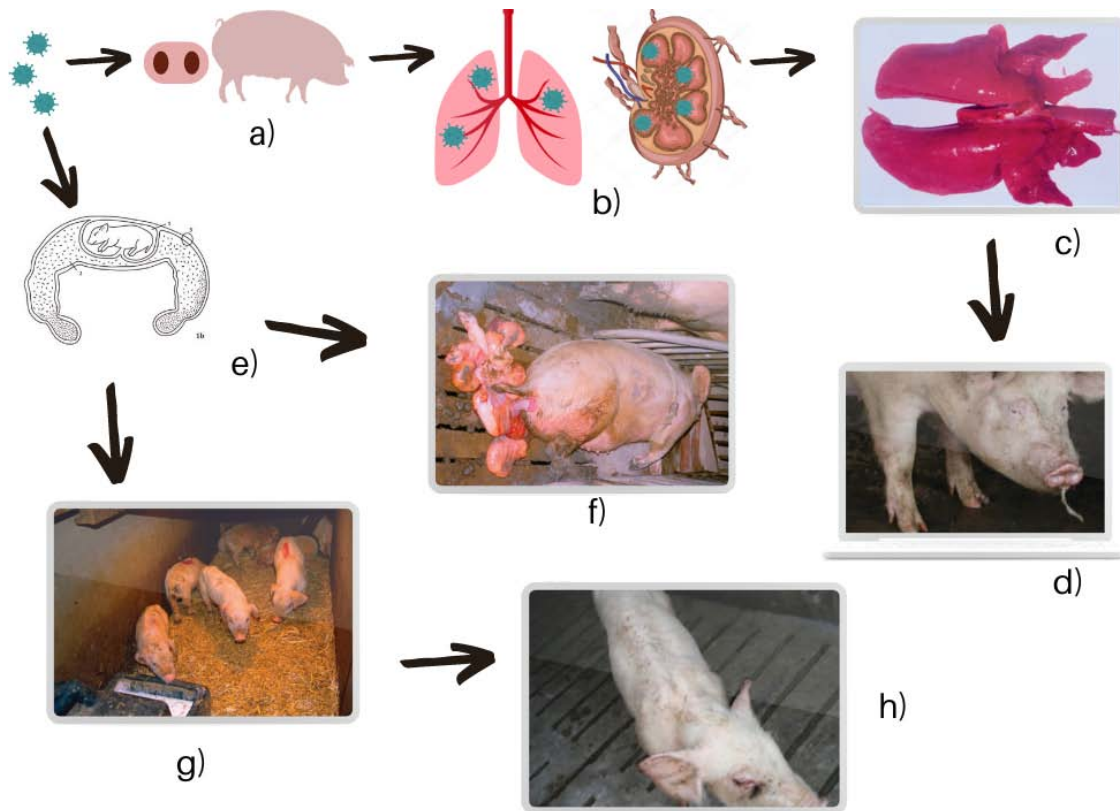


Figura 2. Generalidades en la patogenia de PRRSV. a) Entrada del virus vía nasal, b) Invasión de tejidos pulmonares y linfoides, c) Neumonía intersticial, d) Cerdos con secreciones nasales y tos, e) Virus en la interfaz materno-fetal, f) Abortos, g) Camadas débiles, h) Anorexia y pelaje áspero (Tomado de: c, f, g: Jackson and Cockcroft, (2007); d y h: www.3tres3.com; e: Roa et al. (2013)).

1.5 Diagnóstico

El diagnóstico de PRRS se puede abordar mediante la detección de anticuerpos por medio de la prueba ELISA o por la detección de secuencias específicas de ARN con la prueba RT-PCR. Las muestras típicamente recolectadas para pruebas de laboratorio incluyen suero o sangre, tejidos (pulmón y ganglios linfáticos), lavado broncoalveolar, semen y muestras de fluidos orales de cerdos individuales o en grupo (Prieto, 2017; Zimmerman, 2019).

1.6 Prevención y tratamiento

La prevención se basa en la implementación de protocolos de saneamiento, desinfección y estrategias para reducir la posibilidad de introducir PRRS en rebaños negativos o nuevas variantes de PRRS en rebaños positivos. El uso de vacunas podría reducir la diseminación del virus, aunque la seguridad y eficacia de éstas no están bien establecidas. Las vacunas más utilizadas contra PRRSv son aquellas con virus vivos modificados atenuados (*Cuadro 1*), ya que son mayormente eficaces puesto que la respuesta celular y humoral es mayor que en otras vacunas como es el caso de las inactivadas (*Castro, 2020, Zimmerman, 2019*).

Marca comercial	Vacuna
FOSTERA® PRRS Zoetis ® Reg. SAGARPA B-1196-247	Vacuna de virus vivo modificado de la cepa P129, del virus PRRS. Para la vacunación de cerdos sanos susceptibles a PRRS en hatos positivos. Se ha demostrado una duración de la inmunidad de 19 semanas contra la enfermedad reproductiva en cerdos vacunados antes de su reproducción y 26 semanas contra la enfermedad respiratoria. Se vacuna vía IM una dosis única de 2 ml en cerdos de un día de edad o mayores (Zoetis, 2022).
PRIME PAC® PRRS MSD Salud animal® Reg. SAGARPA B-0273-278	Contiene virus vivo modificado de PRRS tipo 2, Cepa Nebraska. Para la inmunización activa de cerdos clínicamente sanos contra el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS) en un entorno contaminado, para reducir la viremia y los signos clínicos causados por la infección con el virus de PRRS. Se vacuna vía IM 1ml o por vía intradérmica 0.2 ml a cerdos de dos o más semanas de edad (MSD Salud Animal, 2022).

INGELVAC PRRS MLV®
Boehringer Ingelheim®
Reg. SADER B-6407-152

Es una vacuna de virus vivo modificado inactivado de la cepa ATCC-VR-2332, del virus PRRS propagado en cultivos celulares.

Provee protección cruzada contra desafíos heterólogos y reduce significativamente las fallas reproductivas y de enfermedad respiratoria causada por el virus.

Se vacuna vía IM a cerdas adultas y reemplazos antes de cada monta y a lechones de 3 hasta 18 semanas de edad (Boehringer Ingelheim, 2022).

Cuadro 1. Vacunas comercializadas en México contra PRRS. *Modificado de Castro, 2020.*

1.7 Impacto negativo del PRRS en el sector pecuario

El PRRS afecta los parámetros reproductivos y productivos en las hembras y en las camadas de diversas formas, disminuye la fertilidad y el número de lechones paridos vivos con aumento del porcentaje de abortos y de la mortalidad predestete, generando una mayor demanda de insumos con una disminución en el número de lechones destetados al año. El aumento en el consumo de alimento por parte de la hembra y los gastos en el manejo reproductivo (honorarios médicos, métodos hormonales para la sincronización o inducción del celo, materiales desechables, etc.) son factores a sumar para establecer la repercusión de la enfermedad en la disminución de los ingresos (*Amador, 2016*).

De acuerdo con los últimos informes realizados por la OIE, 23 países actualmente cuentan con el estatus de enfermedad presente; 3 países tienen estatus de enfermedad limitada a una o más zonas; 4 países un estatus de infección presente y en 121 países está ausente o no se ha reportado (*SENASICA, 2020*).

El PRRSv tiene la capacidad de reducir la producción anual de una piara en un 15%, ocasionando pérdidas económicas del 10 % hasta el 40% de la producción anual de lechones en las granjas, aunado a un aumento de hasta el 60% de costos de sanidad animal asociados con la prevención y el tratamiento de infecciones secundarias. Durante los informes

semestrales correspondientes a México, PRRSv se distribuye principalmente en el centro y norte del país (Fig.3) (SENASICA, 2020).



Figura 3. Situación de la enfermedad PRRS en México. Distribución de los estados con mayor prevalencia de PRRS en los centros de producción porcina (rojo). *Modificado de OIE, 2020.*

ANTECEDENTES PARTICULARES

1.8 Cultivos celulares

El cultivo celular es un proceso en el cual se aíslan células provenientes de tejido animal o vegetal para su posterior crecimiento en un entorno favorable que apoye su desarrollo y aporte de nutrientes esenciales. Los cultivos celulares de animales se emplean con fines de diagnóstico e investigación principalmente en infecciones virales por lo que la selección adecuada del medio favorecerá el crecimiento, adhesión, proliferación y supervivencia celular del agente patológico (Kumar, 2021). Existe un tipo de población celular que se crea mediante subcultivo en serie de una población de células primarias, que pueden almacenarse. Este tipo de células se denomina línea celular y tiene la ventaja de mantenerse por tiempo indefinido ya que una de sus características es que pueden continuar con su crecimiento y división indefinidamente).

1.9 Células MARC-145

PPRSv se cultiva en macrófagos alveolares aislados de cerdos jóvenes y en líneas celulares de riñón de mono verde africano, especialmente la línea celular MA-104 y su derivado, MARC-145. La línea celular MARC-145 es un cultivo continuo que crece en monocapa y tiene una morfología de tipo epitelial (*cuadro 2*), (*Zimmerman, 2019*).

MARC 145	
Organismo / Especie	<i>Cercopithecus aethiops</i> Mono verde africano
Tejido / Órgano	Riñón
Tipo celular	Epitelial
Propiedades del cultivo	Adherente
Virus susceptibles	PPRSv
Tipo de medio	DMEM o RPMI
Tipo de suero	5-10% FBS
pH	7.4
Temperatura	37°C
Renovación de medio	Cada 2 a 3 días

Cuadro 2. Características de línea celular MARC-145. En el cuadro se citan el origen, tipo y propiedades del cultivo (*Modificado de Lin, 2015*).

1.10 Citoesqueleto

El citoesqueleto está organizado por una red de filamentos proteicos responsables de coordinar la forma celular, la organización interna y las propiedades mecánicas, desde un extremo a otro de la célula. Está compuesto por tres familias de filamentos de proteínas:

filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios que se extienden por todo el citoplasma. Cada tipo de filamento tiene distintas propiedades mecánicas, dinámicas y roles biológicos, pero todos comparten ciertas características fundamentales. Los tres tipos de filamentos se forman a partir de ensamblajes helicoidales de subunidades que se auto asocian mediante contactos proteicos entre extremos y laterales. Este sistema de filamentos es el responsable de los cambios de forma para desplazarse de un lugar a otro además de que también sufren una remodelación constante mediante el ensamblaje y desensamblaje de sus subunidades (*Alberts, 2015, Johnson et al., 2002*).

1.10.1 Filamentos de actina

Los filamentos de actina, también conocidos como microfilamentos, están conformados por la actina que es una proteína de 375 aminoácidos, tienen una estructura flexible que se curva con facilidad y un diámetro entre 5-9 nm, llevan una molécula estrechamente asociada de ATP o ADP y se encuentran dispersos en el citoplasma, pero muy concentrados en la corteza celular. Estos filamentos determinan la forma de la superficie celular, son necesarios para la migración celular y se remodelan cada 48 horas. Las subunidades de actina son cadenas polipeptídicas globulares simples que se ensamblan formando filamentos con distinta polaridad estructural (*Alberts, 2015*).

En los vertebrados existen tres isoformas de la actina llamadas α , β y γ , que se diferencian ligeramente en su secuencia de aminoácidos. En los mamíferos existen al menos 6 genes de actina diferentes que expresan las isoformas α se expresa sólo en las células musculares y su número es particularmente alto donde actúan como parte central de la maquinaria responsable de la contracción muscular, mientras que las actinas β y γ se encuentran juntas en casi todas las células no musculares. Forman prolongaciones como son lamelipodios que las células utilizan para migrar o los filopodios para sensar el medio ambiente y comunicación celular (*Alberts, 2015; Pollard & Earnshaw, 2008*).

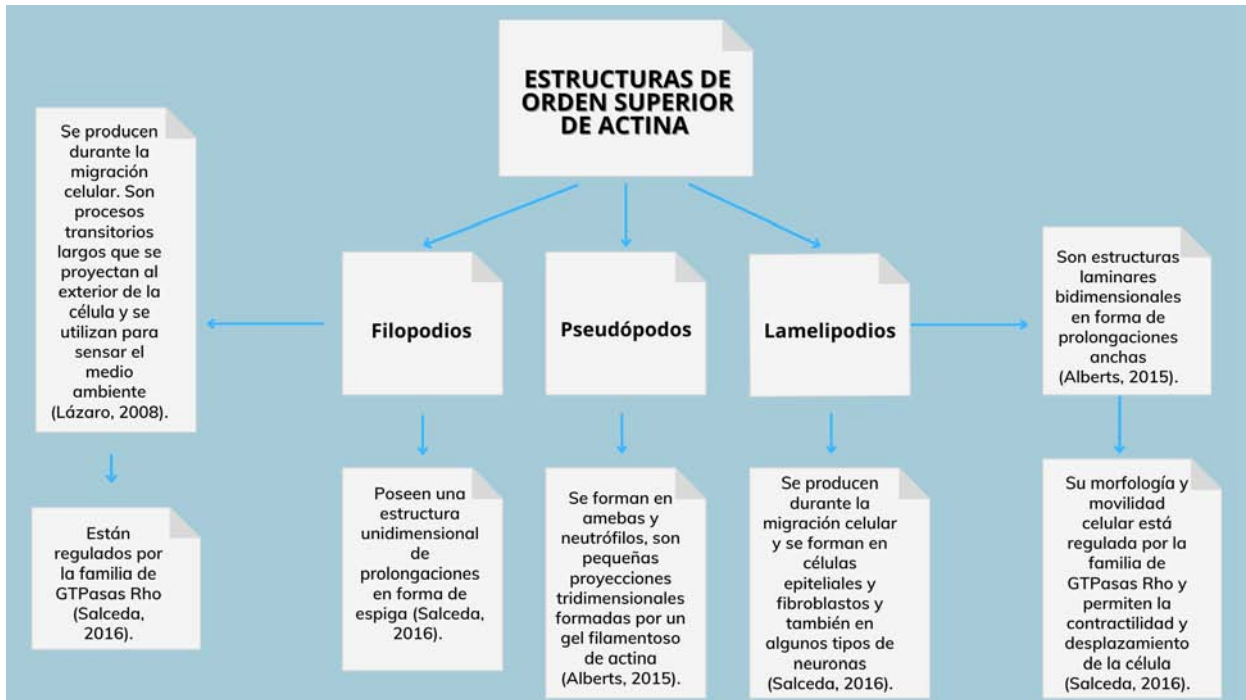


Figura 4. Estructuras de orden superior de actina. En el diagrama se citan las estructuras de orden superior de actina, describiendo sus principales características morfológicas.

1.10.2 Microtúbulos

Los microtúbulos tienen una estructura cilíndrica hueca formada por 13 protofilamentos generados por la polimerización de dímeros de tubulina, tienen forma de estrella y se originan de diferentes sitios de la célula denominados centros de organización de microtúbulos (centrosoma, cuerpo basal, polos del huso mitótico, aparato de Golgi y corteza celular). Determinan las posiciones de los orgánulos limitados por membrana, el transporte intracelular directo, anclar organelos membranosos, forman el huso mitótico que segrega los cromosomas durante la división celular y forman prolongaciones llamadas cilios y flagelos los cuales actúan como medios de propulsión o despejando el fluido presente sobre la superficie celular (*Alberts, 2015; Estévez, 2020; de Juan et al. 2022*)

Cada dímero de tubulina está formado por dos proteínas globulares denominadas tubulina α y tubulina β , que están unidas entre sí mediante enlaces no-covalentes. Las proteínas α o β tienen un lugar de unión para una molécula de GTP, pero en la tubulina α el GTP nunca puede ser hidrolizado o expulsado y en la tubulina β si puede ser hidrolizado y aparece tanto en forma de GTP como de GDP. También existe la tubulina γ , pero está presente en mucha

menos cantidad que la tubulina α y β , y está implicada en la nucleación del crecimiento de los microtúbulos en los centros de organización de microtúbulos (*Alberts, 2010*).

1.10.3 Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios tienen apariencia de cuerda, se pueden deformar fácilmente, pero difícilmente se rompen y tienen un diámetro aproximado de 10 nm. El tetramero es la subunidad soluble de los filamentos intermedios y está formado por polipéptidos individuales que son moléculas alargadas que se enroscan con otra igual formando una superhélice, se empaquetan y dan lugar al filamento, formado por ocho protofilamentos (*Alberts, 2010*).

A diferencia de los filamentos de actina y los microtúbulos, los filamentos intermedios no tienen ningún lugar de unión para moléculas de ATP o GTP, puesto que los bloques tetraméricos de construcción carecen de polaridad, el filamento ensamblado tampoco la tiene, esta es otra característica que distingue los filamentos intermedios de otros elementos del citoesqueleto, por lo que el ensamble y desensamble se controlan sobre todo por fosforilación y desfosforilación de las subunidades (*Karp, 2011*).

Son abundantes en el citoplasma de las células sometidas a estrés mecánico por lo que les proporcionan fuerza y resistencia durante este proceso. Adicionalmente forman una red protectora para el DNA como sus ancestros las láminas nucleares, proteínas que forman una red que delimita la membrana interna del núcleo de las células, proporcionando lugares de anclaje a los cromosomas y poros nucleares (*Alberts, 2010*).

Se dividen en cinco clases principales (I-V); las clases I y II comprenden a las queratinas que es la familia más diversa y proporcionan fuerza mecánica a los tejidos epiteliales. La clase III está compuesta por vimentina, desmina y la proteína gliofibrilar ácida. Los filamentos de vimentina son constituyentes importantes en fibroblastos en cultivo, donde forman una red radial que se origina en el centro y que se extiende hasta la periferia de la célula. La desmina se encuentra en las células musculares y la proteína gliofibrilar ácida es característica de las células gliales que rodean y aíslan a las células nerviosas que se encuentran principalmente en tejido conectivo. La clase IV la constituyen las proteínas de los neurofilamentos que se

encuentran a lo largo de los axones. Por último la clase V son las láminas nucleares A, B y C, que forman un andamio filamentoso bajo la superficie interna de la membrana nuclear de prácticamente todas las células eucariotas (*Becker et al., 2007; Alberts, 2010*).

Se tiene muy poca información acerca de los filamentos intermedios pero algunos tipos de proteínas de los filamentos como la vimentina forman estructuras altamente dinámicas en células como los fibroblastos (*Alberts & Bray, 2011*).

1.10.3.1 Vimentina

La vimentina es una proteína perteneciente a los filamentos intermedios cuyo nombre deriva de la palabra *vimentum* que significa cestería (mimbre) (*Battaglia, 2022*) y constituye uno de los elementos más importantes del citoesqueleto. La vimentina es una proteína de 57 kDa, cuyos filamentos tienden a congregarse alrededor del núcleo, desde donde irradian hacia la membrana plasmática, Se ha supuesto que estos filamentos mantienen la localización del núcleo, y probablemente del centriolo y del complejo de Golgi, proporcionándoles un soporte mecánico y fijando su posición (*Paniagua, 2017*). Las células móviles e invasivas expresan niveles más altos de vimentina y su inactivación disminuye la migración de fibroblastos, leucocitos, astrocitos y varios tipos de células cancerosas (*Battaglia, 2022*).

La trama de filamentos de vimentina es muy dinámica además de conferir soporte estructural y resistencia a la tensión mecánica, desempeña un papel crucial en la migración celular y en la transición epitelio-mesénquima, un proceso implicado en la metástasis tumoral. Es el primero los elementos del citoesqueleto en formarse en cualquier tipo de célula eucariota (*Lira, 2019*).

Se le relaciona con una serie de proteínas accesorias (*Cuadro 3*) y además se ha demostrado que juega un papel importante en diferentes funciones como es el caso de la transición epitelio-mesénquima; proceso que ocurre durante el desarrollo celular normal, la cicatrización de heridas y en otros eventos como es la metástasis (*Battaglia, 2022*). Se cree que la vimentina participa en la replicación del virus de PRRS y el transporte del virus al interior de las células formando un complejo con otros componentes de filamentos

intermedios. Se ha identificado como una parte importante del complejo receptor de PRRSV interactuando indirectamente con la proteína no estructural 2 (NSP2) (Chang, 2018; Joaquín de Juan Herrero, 2022).

	Componente polipeptídico	Localización
Proteínas relacionadas con la vimentina	Vimentina	Muchas células de origen mesenquimático
	Desmina	Músculo liso, cardíaco y esquelético
	Proteína glial ácida fibrilar	Células gliales (astrocitos y algunas células de Schwann)
	Periferina	Algunas neuronas

Cuadro 3. Proteínas relacionadas con vimentina. El cuadro resume el tipo y localización de las proteínas relacionadas con vimentina. (Alberts, 2010).

1.11 Citoesqueleto y virus

Los componentes virales interactúan con la maquinaria del citoesqueleto del huésped durante la transcripción viral como es en el caso de los paramixovirus o la transcripción inversa y gemación viral como en el caso del VIH. Aunque los filamentos del citoesqueleto proporcionan facilidades para el transporte viral citoplasmático también restringen el espacio que está abierto para la translocación (Döhner, 2004).

De acuerdo a un estudio realizado en 2006 los grupos de células infectadas con PRRSV mostraron que la transmisión del virus depende de la función citoesquelética, esto debido a inhibidores de microtúbulos que suprimieron la propagación secundaria del virus. También se ha observado una diferente apariencia en los filamentos de actina de células infectadas con PRRSV, este hallazgo sugiere que la actina proporciona una barrera protectora para la transmisión de célula a célula (Cafruny, 2006). También se ha reportado que los filamentos de vimentina, en conjunto con la proteína ANXA2, son requeridos para la infección viral, replicación y transcripción (Chang et al., 2018).

II. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo busca estudiar el efecto de la infección viral en células MARC-145, sobre uno de los filamentos proteicos vitales del citoesqueleto: la vimentina, con la finalidad de tener un modelo celular que permita la identificación de cambios inducidos por la infección *in vitro* con PRRSv que brinde más información sobre los mecanismos de invasividad de este virus.

III. HIPÓTESIS

La propagación viral de PRRS induce cambios en la estructura del citoesqueleto de vimentina en células MARC- 145.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general: Estudiar la morfología normal del citoesqueleto de vimentina en células MARC-145 para tener un modelo celular que permita la identificación de cambios inducidos por la infección *in vitro* con PRRSv.

Objetivos particulares:

- Desarrollar habilidades para el manejo de cultivos celulares, mediante el mantenimiento y propagación de la línea MARC-145 como material biológico para la realización de los experimentos planteados en este trabajo.
- Estandarizar el protocolo de inmunofluorescencia indirecta con triple marcaje en células MARC-145 para la visualización del citoesqueleto de vimentina, citoesqueleto de actina y núcleo celular, para determinar la estructura celular normal.
- Evaluar el efecto de la infección con PRRSv en las células MARC-145 determinando alteraciones de los filamentos de vimentina mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta y cambios en la morfología y estructura celular a través de microscopía de fluorescencia.
- Descripción y comparación de los cambios estructurales en el citoesqueleto de vimentina durante la infección aguda mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo celular

5.1.1 Línea MARC-145

Se utilizó la línea celular MARC-145 por su alta permisividad al virus de PRRSv. Un vial de células MARC-145 proveniente del banco de células del Laboratorio 4 "Biología Celular y Morfología Veterinaria", fueron descongeladas para su cultivo en monocapa con medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 10% (fase de propagación/cultivos no infectados) o 4% (cultivos infectados *in vitro* con PRRSv) de suero fetal bovino (SFB); y antibiótico: penicilina (5000 UI) - estreptomina (5 µg/ml), bajo un ambiente estéril en una incubadora humidificada marca Thermo Scientific con una mezcla de 95:5 aire/CO₂ a 37°C, hasta el alcance de una confluencia de 80-90% para su uso (*Fig. 5*).

a

b

Figura 5. Equipos empleados en el proceso de cultivo celular.

(a) Microscopio invertido utilizado para la observación de la confluencia celular de los cultivos, (b) Incubadora de células y tejidos.

Equipamiento del cuarto de cultivo celular, L4, UIM, FES-C.

5.1.2 Tripsinización y Pase celular

Una vez confluyente, el cultivo se propagó para tener la suficiente cantidad de células para abastecer las necesidades de los distintos experimentos planteados en este trabajo, para ello se agregó tripsina al 0.5% + EDTA y se incubó hasta observar el cambio morfológico a

formas "redondeadas", características propias del desprendimiento de las células de la monocapa. Se recuperaron las células y se colocaron en un tubo falcón estéril de 15 ml, para someterse a un ciclo de centrifugación de 1500 rpm durante 10 min, posteriormente se pudo visualizar el botón celular al fondo del tubo y en la campana de flujo laminar se decantó el medio sobrenadante (Fig. 6). El botón celular fue resuspendido en 1 ml de RPMI (para su propagación en más cajas de cultivo) o en solución de congelación (para su almacenamiento en el criotermino).



Figura 6. Campana de flujo laminar.

La campana de flujo laminar es un área de trabajo estéril indispensable para el trabajo de cultivos celulares.

Cuarto de cultivo, L4-UIM FES-C.

Las cajas de cultivo seleccionadas para los ensayos de infección viral fueron trabajadas con medio RPMI al 4%, se evaluaron tiempos de 24, 48 y 72 hpi.

5.1.3 Sembrado de células en cubreobjetos

Las cajas de cultivo fueron previamente preparadas con cubreobjetos de vidrio esterilizados por flameo con alcohol absoluto, una vez depositados los cubreobjetos se agregó el medio de cultivo al 4%, las células fueron sembradas y se observaron a las 24 h para verificar la

adherencia de las células a los cubreobjetos y diariamente para determinar el momento en que presentaban una confluencia cercana al 70%.

5.1.4 Protocolo de infección viral in vitro

Se empleó el PRRSv proveniente de una vacuna comercial viva atenuada INGELVAC PRRS MLV del laboratorio Boehringer Ingelheim con la cepa ATCC-VR 2332 (Fig. 7). El PRRSv se propagó empleando medio de cultivo infectado.



Figura 7. Vacuna empleada en el proceso de cultivo celular.

5.2 Técnica de inmunofluorescencia

Las células cultivadas en cubreobjetos previamente esterilizados se fijaron con formalina acuosa al 10% en PBS durante 20 min a TA, se permeabilizó con tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 min y posteriormente se bloqueó con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS por 20 min. Una vez realizados los pasos anteriores las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-Vimentina (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C toda la noche en cámara húmeda, después se realizó la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a isotiocianato de fluoresceína (*goat anti-mouse IgG-FITC: sc 2010, Santa Cruz Biotechnology*) toda la noche a 4°C, en cámara húmeda. Una vez finalizado las células se sometieron a la última incubación con faloidina conjugada a isotiocinato de rodamina durante 20 min a TA, protegidas de la luz, para proceder al montaje con 4'6-diamino-2-fenilindol (DAPI) en portaobjetos (Fig. 8). Durante cada paso del proceso las muestras fueron lavadas

en 3 ocasiones con PBS 1x. Las laminillas se almacenaron a 4°C en condiciones de oscuridad hasta su observación con el microscopio de fluorescencia.

Esta técnica es utilizada para visualizar proteínas de interés en diferentes células.



Figura 8. Material utilizado en la técnica de inmunofluorescencia.
L-4, UIM, FESC.

5.2.1 Microscopio de fluorescencia

Las imágenes se digitalizaron por medio de un microscopio marca Zeiss modelo Axioskop 40 con los objetivos de 20X y 40X respectivamente para después ser clasificadas en un banco de imágenes.

5.3 Procesamiento y análisis de imágenes

5.3.1 Software ImageJ

Se utilizó el software libre Image J para el análisis de imágenes junto con la función de “Z project” para su visualización en forma conjunta de actina, vimentina y DAPI (merge).

Para realizar la calibración del software se tomaron 3 imágenes de una cámara de Neubauer con los objetivos de 10X, 20X y 40X del microscopio de fluorescencia, con la finalidad de

medir uno de los cuadrantes internos de la cámara y hacer una escala equivalente a μm , lo anterior permitió obtener una escala para cuantificar el tamaño celular y el tamaño de estructuras de interés.

Una vez determinada la escala se empleó la función de “herramientas de escala para microscopios” y se añadieron los valores correspondientes a los 3 diferentes objetivos, para guardar los datos del microscopio de trabajo y emplear esta configuración para el posterior análisis del banco de imágenes.

VI. RESULTADOS

Mediante la técnica de inmunofluorescencia de triple marcaje se logró el marcaje de los filamentos de vimentina (verde), de actina (rojo), así como de los núcleos en las células MARC-145 (azul), los cuales fueron visualizados mediante microscopía de fluorescencia empleando 3 diferentes filtros en el mismo campo visual. Mediante el software ImageJ las microfotografías fueron procesadas para la colocación de la barra de medida según el objetivo empleado al momento de captar la imagen, así como para realizar el empalme de las señales (merge) (*Fig. 9*). Lo anterior permitió ver la colocación de los marcajes para la evaluación de los tres componentes celulares (solos y en conjunto), esto en cultivos sembrados en alta y baja confluencia (*Fig. 10*).

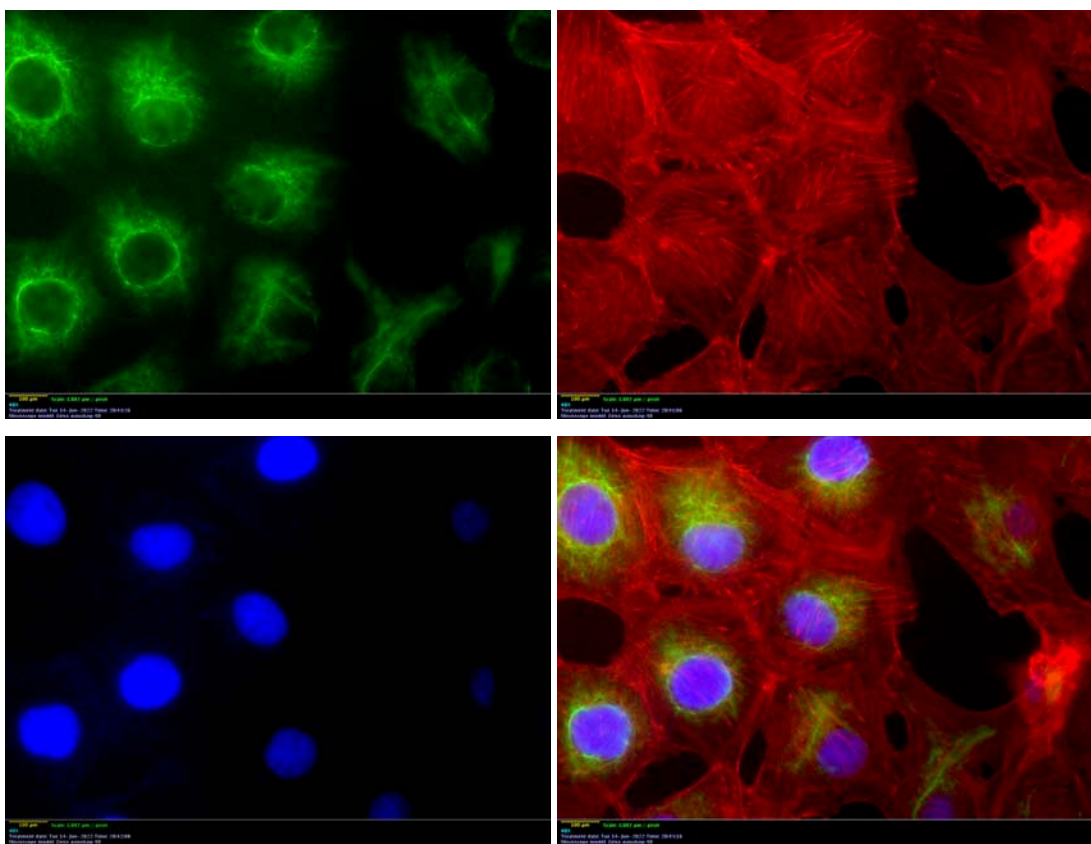


Figura 9. Fotomicrografías de fluorescencia en células MARC-145.
(A) Vimentina, (B) Actina, (C) DAPI, (D) Merge. Microscopía de fluorescencia, 40X.

La distribución de los filamentos de vimentina en las células MARC-145 demostró un patrón bien definido y con una disposición radial por todo el citoplasma. Los filamentos de actina

se observaron con un patrón de distribución y estructura bien definidos, mostrando en particular fibras de estrés. Los núcleos se observan con buena morfología y estructura.

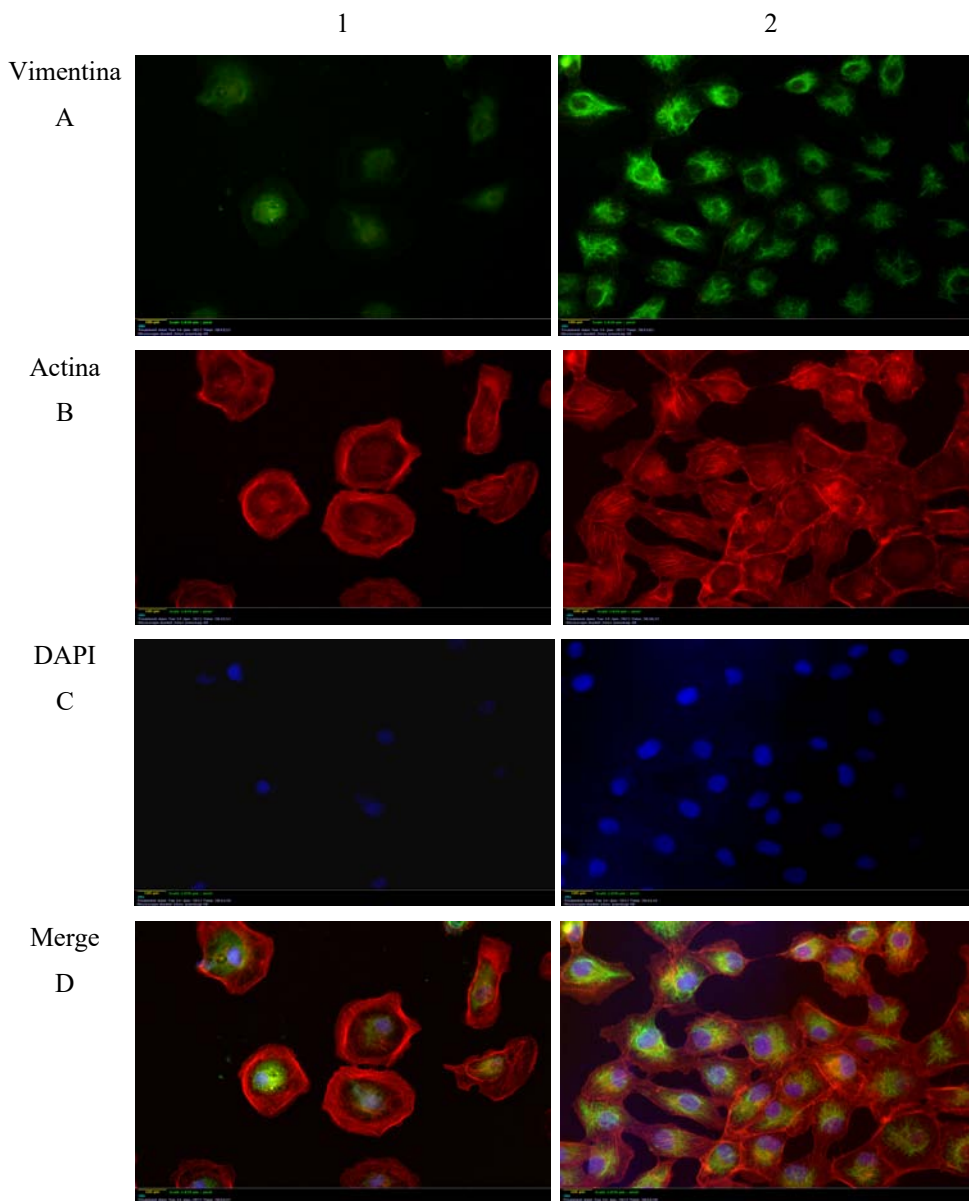


Figura 10. Cultivos de la línea celular MARC-145 control. Células en baja (columna 1) y alta confluencia (columna 2). Fila A: vimentina; fila B: actina; fila C: DAPI; fila D: Merge. Flechas amarillas señalan la distribución de los filamentos de vimentina, el marcaje presenta una localización perinuclear irradiando de esta zona hacia la membrana celular, esta irradiación en red citoplasmática fue más evidente en los cultivos de alta confluencia (2A), mientras que en los cultivos de baja confluencia el marcaje predominó a nivel perinuclear (1A). En la fila B, se aprecia marcaje del citoesqueleto de actina, con las fibras de estrés bien definidas en toda la célula y a nivel cortical. Fila C, núcleos celulares de forma esférica con posición central y bordes bien definidos. Fila D, Merge, colocalización de los marcajes para el citoesqueleto de actina, vimentina y el marcaje de núcleos. Microscopía de fluorescencia, 20X.

Una vez realizada la técnica de inmunofluorescencia de triple marcaje en células sin infectar, se realizó la infección de cultivos con el PRRSv, para seguir el curso de la infección a tres diferentes tiempos: 24, 48 y 72 hpi (*Figs. 11-16*).

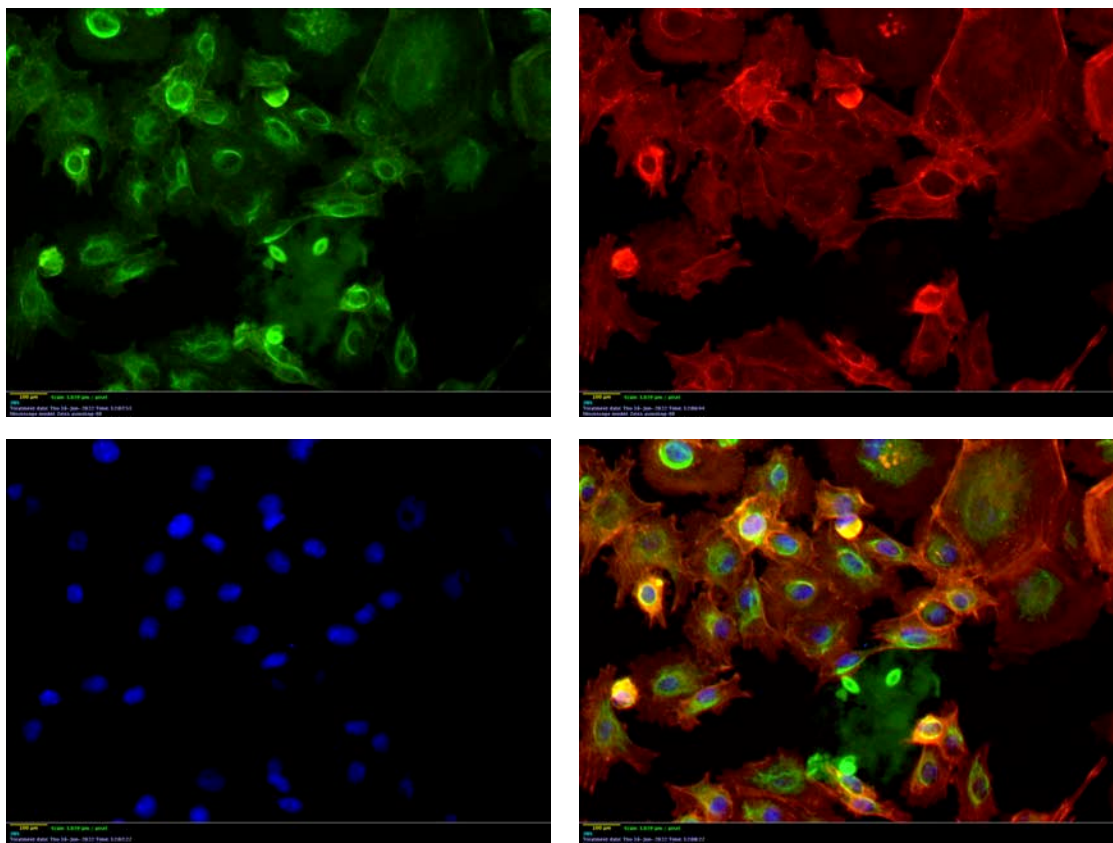


Figura 11. Agregados perinucleares MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi. Imagen A: vimentina; Imagen B: actina; Imagen C: DAPI; Imagen D: Merge. A las 24 hpi se observó en los cultivos marcaje positivo a vimentina con un patrón de localización predominante en la corteza perinuclear (A, flechas amarillas), estos agregados no colocalizan con la corteza perinuclear de actina en el merge (D, flechas blancas) y se mantienen rodeando a los núcleos los cuales a este tiempo posinfección no evidencia cambios en su morfología o posición céntrica en las células. Microscopía de fluorescencia, 20X.

El principal cambio de los filamentos de vimentina a las 24 horas postinfección fue la presencia de un marcaje intenso a nivel perinuclear, estos agregados perinucleares colocalizan con la zona nuclear, pero no los filamentos perinucleares de actina.

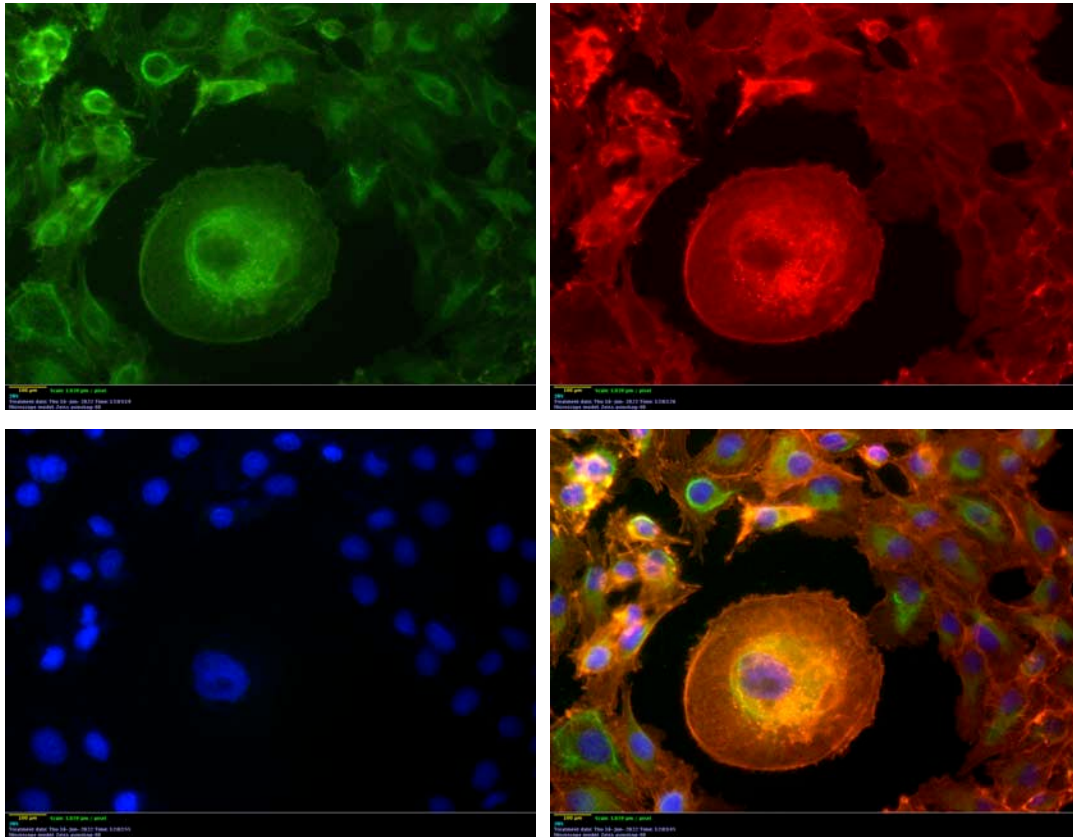


Figura 12. Células gigantes MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi. Imagen A: vimentina; Imagen B: actina; Imagen C: DAPI; Imagen D: Merge. A las 24 hpi se observa la formación de células gigantes, las cuales no presentan la morfología normal de las células MARC-145, estas células se mantienen aisladas de las otras, a nivel citoplasmático los filamentos de actina se observan despolimerizados sin los patrones radiales y fibras de estrés característicos (B), mientras que el patrón de vimentina se limita a la zona perinuclear sin irradiar hacia la corteza celular (A, D). Microscopía de fluorescencia, 20X.

Posterior a las 24h de la infección de los cultivos se observó la formación de células con un tamaño aumentado respecto a la población normal (*Fig. 12*), estas células gigantes respecto a su tamaño, presentaban un solo núcleo (*Fig. 12-C*) con un patrón poco definido de los filamentos de actina a nivel citoplasmático, esta despolimerización del citoesqueleto de actina colocalizó con el marcaje de la vimentina en la zona perinuclear.

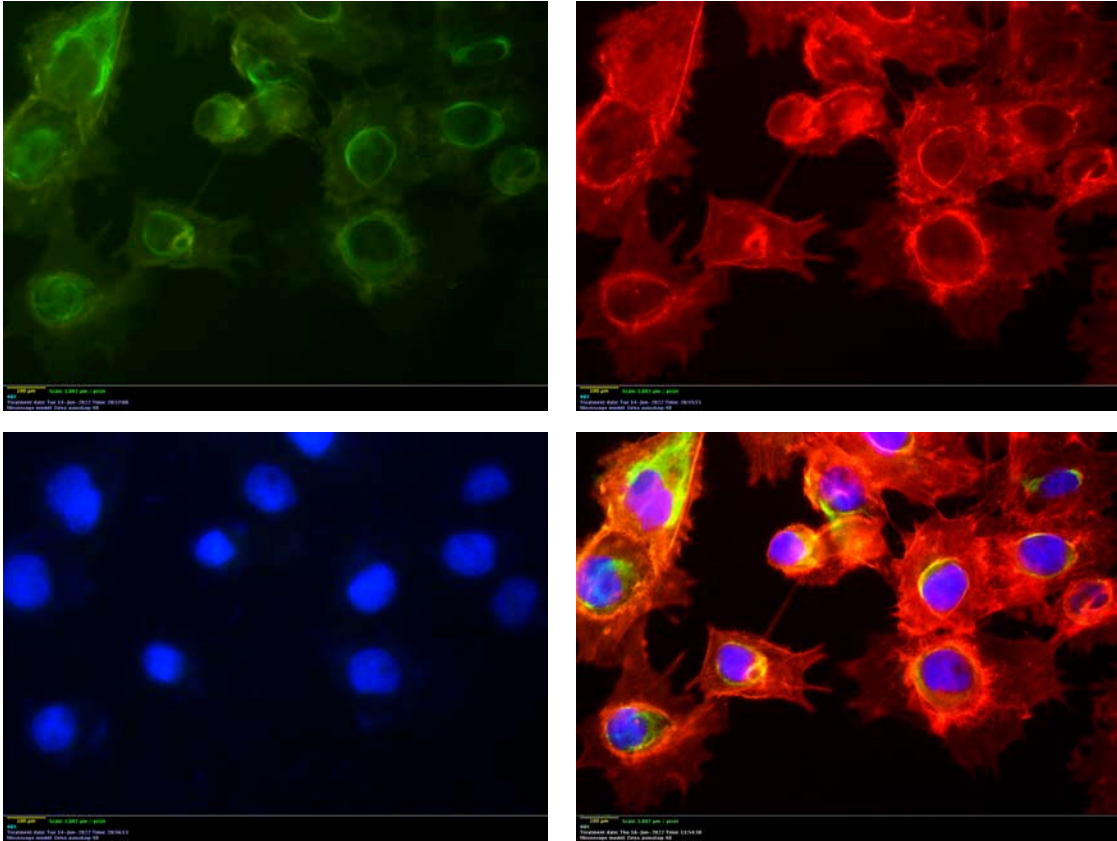


Figura 13. Filopodios MARC-145 infectadas con PRRSV a las 24 hpi. Imagen A: vimentina; Imagen B: actina; Imagen C: DAPI; Imagen D: Merge. las flechas amarillas muestran la presencia de filopodios, estructura de orden superior de actina especializada en sensar el ambiente que rodea a la célula. Microscopía de fluorescencia, 40X

Otro evento celular que se presentó a las 24 hpi, fue la presencia de numerosos filopodios, los cuales se observaron entre las células que no presentaban un contacto directo, estas estructuras de actina variaban tanto en su longitud como en cantidad (*Fig. 13, flechas amarillas*).

Al avanzar el curso de la infección se observó la presencia de masas multinucleares producidas por la fusión de muchas células; estas estructuras se conocen como sincitios (*Fig. 14*).

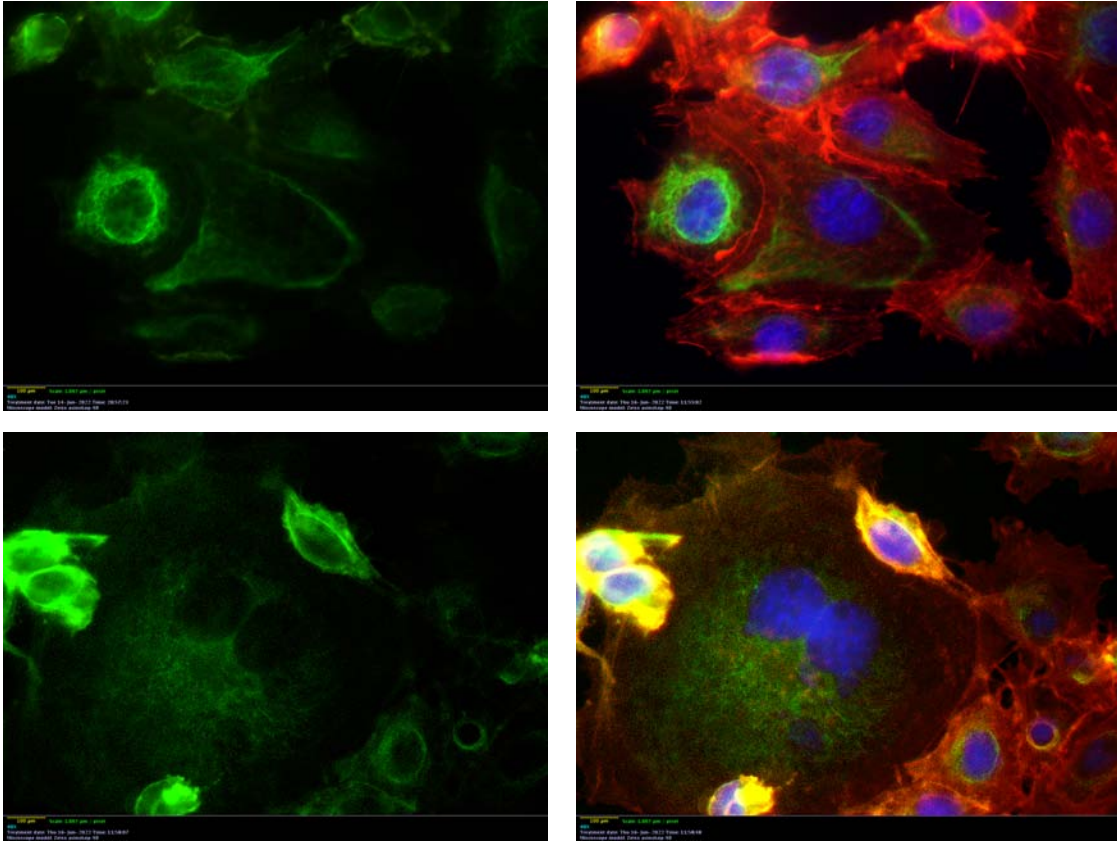


Figura 14. Sincitios MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi. A: vimentina; B: actina; C: DAPI; D: Merge. A y B: inicio de la formación de sincitio, la flecha blanca marca el sitio de fusión de membrana entre dos células contiguas. C y D: sincitio establecido, presencia de una célula gigante binucleada con un patrón la vimentina despolimerizada por todo el citoplasma. Microscopía de fluorescencia, 40X.

Las células gigantes con presencia de más de un núcleo permiten reconocer el establecimiento de sincitios, los cuales se derivan de la unión de dos o más células, las cuales combinan su contenido citoplásmico, no así el nuclear. Estos sincitios mostraron un enorme tamaño, con un patrón desorganizado de vimentina a nivel citoplásmico (*Fig. 14, C-D*) alrededor del sincitio se presentaron células pequeñas con abundante agregación de vimentina, la cual aparece colocalizada con agregaciones de actina dando como resultado un color amarillo en el merge (*Fig. 14 C-D*).

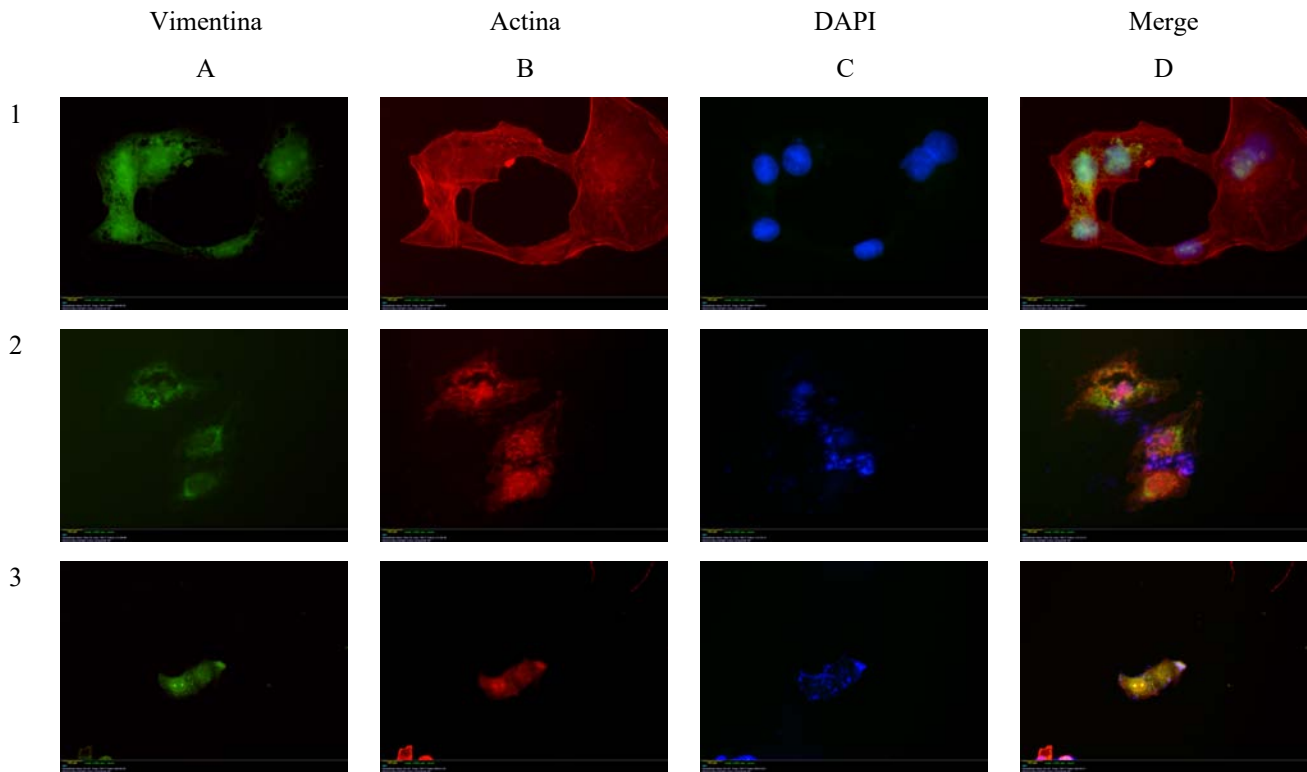


Figura 15. Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. A: vimentina; B: actina; C: DAPI; D: Merge. A las 48 hpi los cultivos mostraron una marcada despolimerización del citoesqueleto de vimentina y actina. En la región citoplasmática desapareció el patrón de distribución de la vimentina que irradia de la zona perinuclear hacia la membrana celular, evidenciando un marcaje sin una distribución definida (flechas blancas); la despolimerización de la actina presentó un patrón grumoso sin que pudiera visualizarse las fibras de estrés (flecha amarilla). A nivel nuclear se generó un patrón de puntillado difuso de material en todo el citoplasma (flecha anaranjada). Las figuras 1, 2 y 3 muestran células de 3 campos aleatorios donde se evidencia el daño. Microscopía de fluorescencia 40X.

Las figuras de los cultivos de 48 hpi, evidenciaron una alteración notoria en la integridad de la monocapa, caracterizada por cambios en el tamaño de las células, formación de sincitios (*Fig. 15*) y disminución de la población celular (*Fig. 15*). Las figuras permitieron observar daño nuclear debido a la pérdida de la morfología tanto en su posición como en su estructura caracterizado por una fragmentación, desordenada con tamaños irregulares, sugerente de un proceso avanzado de muerte celular (*Fig. 15*).

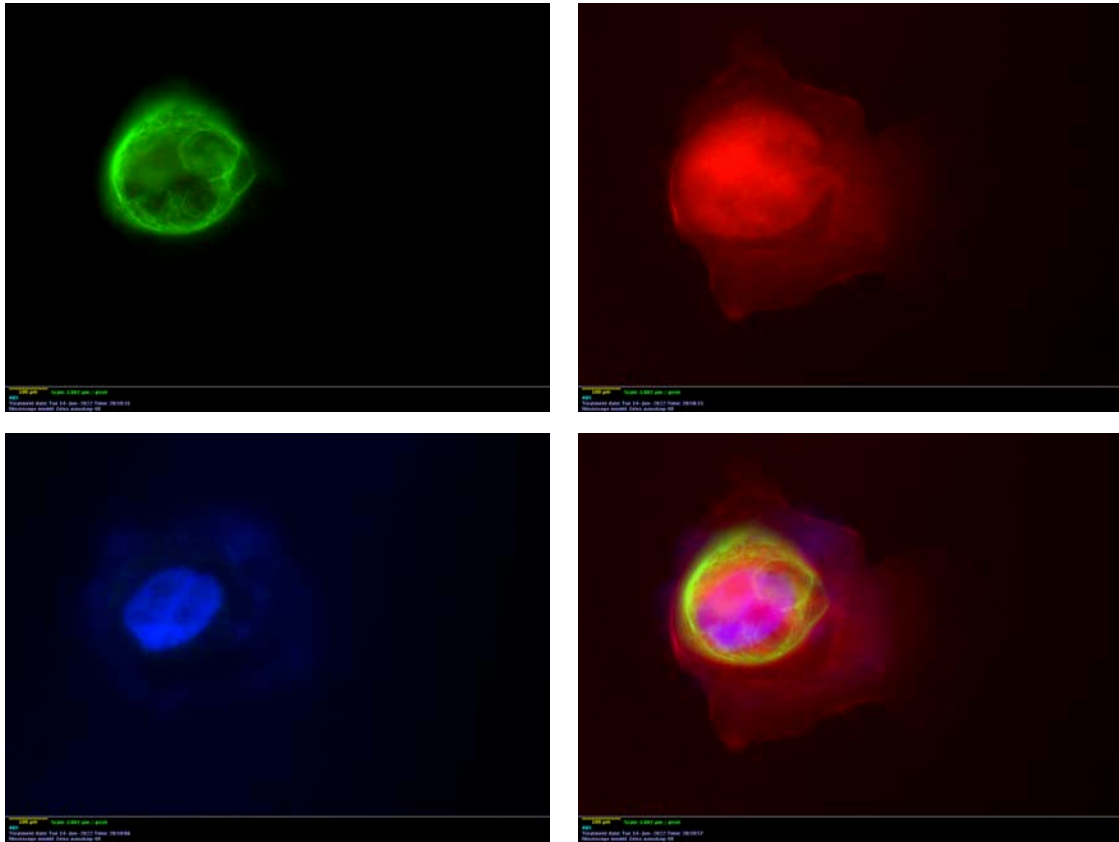


Figura 16. Línea celular MARC-145 a las 72 hpi con el virus PRRS. Imagen A: vimentina; Imagen B: actina; Imagen C: DAPI; Imagen D: Merge. Células aisladas por la destrucción masiva de la monocapa, los patrones morfológicos de la actina y la vimentina a nivel citoplasmático y perinuclear fueron severamente afectados (Figuras A y C). Microscopía de fluorescencia, 40X.

A las 72 hpi, la visualización de células fue difícil ya que la integridad de la monocapa se afectó casi en su totalidad, permitiendo localizar células aisladas con patrones morfológicos afectados (*Fig. 16*) comparados con el cultivo control (testigo) (*Fig. 9*). El citoesqueleto de vimentina presente a nivel citoplasmático en los cultivos control no fue visualizado en las células infectadas a las 72 hpi, manteniéndose un marcaje positivo en la zona perinuclear y colocada con una expresión difusa de actina.

VII. DISCUSIÓN

Este proyecto se enfocó en complementar el modelo morfológico desarrollado por Jardon en 2019, el cual permitió estudiar las estructuras del citoesqueleto de actina en cultivos MARC-145. Durante esta investigación se realizó la descripción detallada de las estructuras de orden superior de actina en cultivos MARC-145 en alta y baja confluencia, para posteriormente, realizar estudios de infección viral con PRRSv de origen vacunal, y los cambios por esta infección se realizaban en el citoesqueleto de actina, logrando obtener un modelo morfológico para el estudio de este virus y los tratamientos desarrollados contra este patógeno, sin embargo el citoesqueleto tiene más componentes que la actina, tal es el caso de la familia de los filamentos intermedios. Los filamentos intermedios solo se encuentran en organismos pluricelulares y son muy diversos, contrario a los filamentos de actina y microtúbulos que han sido muy conservados a lo largo de la evolución de la célula eucariota, esto se debe a la gran variedad de formas específicas de tejido en el citoplasma de las células animales, como lo menciona Becker y col. en el 2007.

Los filamentos intermedios son los componentes más estables del citoesqueleto y juegan un papel fundamental al proporcionar a la célula resistencia mecánica formando una red que rodea al núcleo y que se extiende hasta la periferia celular, interaccionando con la membrana plasmática, esto permite que las células toleren el esfuerzo mecánico asociado con el estiramiento, suelen estar anclados a la membrana en las uniones intercelulares denominadas desmosomas, sitio donde la membrana plasmática se conecta con la de otra célula (*Martínez Pérez, 2010; Alberts H. J., 2021*), además de rodear a la superficie interna de la envoltura nuclear, formando una red protectora para el ADN, denominada lámina nuclear (*Paniagua, 2017*).

La familia de filamentos intermedios se clasifica en 4 clases; el presente trabajo se enfoca en la vimentina, componente de la clase III de filamentos intermedios al igual que la desmina y la proteína gliofibrilar ácida. Los filamentos de vimentina son constituyentes importantes en fibroblastos en cultivo, donde forman una red radial que se origina en el centro y que se extiende hasta la periferia de la célula, sin embargo, la estructura del citoesqueleto de vimentina en células MARC-145 no ha sido reportada.

Nuestros resultados muestran que la vimentina está localizada predominantemente en la zona perinuclear en las células MARC-145 observadas en baja confluencia (*Fig. 3, A-3*) en las cuales la formación de filamentos irradian del centro a la membrana celular, a diferencia de los cultivos de alta confluencia en los cuales se logró visualizar una expresión importante a nivel citoplasmático (*Fig. 3, A-1*), manteniendo la expresión perinuclear, lo que parece indicar una participación activa en la resistencia celular que apoya a las estructuras de orden superior de actina, que favorecen el contacto célula-célula (*Fig. 3, B-3*). La integridad nuclear evaluada en los cultivos control permitió visualizar el núcleo de forma redonda, con posición céntrica, que al análisis "merge" colocalizó con la expresión de vimentina en la zona perinuclear, lo que refuerza la participación de la vimentina en la estructura del núcleo en las células MARC-145 (*Fig. 3, D-3*).

Una vez descrita la morfología normal del citoesqueleto de vimentina en las células MARC-145, los cultivos fueron infectados para evaluar los cambios en la estructura del citoesqueleto de vimentina durante la replicación con PRRSv. Cafruny y col. en el 2006 reportaron que la transmisión viral es dependiente de un citoesqueleto intacto, en particular los filamentos de vimentina (*Chang, 2018*). Jardon y col. en el 2018 corroboraron que la morfología de los filamentos de actina se ve alterada durante el proceso de infección viral, lo que parece indicar que existe una modificación importante del citoesqueleto inducida por el PRRSv, por lo que su capacidad de infectividad podría ser dependiente de la manipulación de este.

En el 2006 Kim y col., evaluaron el efecto de la expresión de vimentina PRRSv en receptores de la superficie de las células MARC-145, y otras líneas celulares no permisivas a la infección por PRRSv, se reportó que la infección provocó opsonización y endocitosis del virus, mientras que a los cultivos BHL-21 y CRFK (no sensibles a la infección por PRRSv) se les administró vimentina de simio y se volvieron susceptibles a la infección con PRRSv (*Kim, 2006*), lo que sugiere una participación importante del citoesqueleto de vimentina en la infección viral, y la importancia de establecer un modelo morfológico de este componente del citoesqueleto en la línea de elección mundial para el estudio del PRRSv, utilizando la línea MARC-145.

En un estudio realizado por Zhuang y col. en el 2012, donde se identificaron proteínas expresadas en células MARC-145 y PAM infectadas con PRRSv por medio de métodos proteómicos (Western Blot y RT-PCR), se encontraron aumentados los niveles de cofilina-1 y vimentina, los autores mencionan que a pesar de no ser proteínas específicas de la enfermedad, los cambios detectados fueron causados por la infección por PRRSv provocando una reorganización de la vimentina lo que probablemente conduce a una estructura citoesquelética inestable.

Nuestros resultados mostraron que durante la infección con PRRSv, evaluada a las 24 hpi, existía un patrón alterado en la expresión de vimentina caracterizado por un aumento en el marcaje en la zona perinuclear (*Fig. 5-A*), y en zonas de colocalización con alteraciones de las fibras de estrés del citoesqueleto de actina (*Fig. 5-B,D*), la formación de estos conglomerados de vimentina fue más evidente en los sitios iniciales de formación de sincitios, lo anterior a la evaluación morfológica por microscopía de fluorescencia (*Fig. 6*).

En los sincitios bien establecidos, la expresión de vimentina fue predominante de la zona perinuclear a nivel citoplasmático, irradiando hacia la periferia de la cara interna de la membrana celular (*Fig. 8*). Durante la replicación de algunos virus con envoltura, en la membrana de la célula infectada se insertan proteínas víricas de fusión que inducen la fusión con otras membranas de las células adyacentes. El resultado es que se combinan los citoplasmas de las células implicadas, pero no así los núcleos, si esto ocurre reuniendo a varias células se forman células multinucleadas que reciben el nombre de sincitios. Para el virus esto supone poder infectar células sin salir al espacio extracelular, donde podría ser neutralizado por los anticuerpos, esto podría ser una solución a corto plazo por que los sincitios acaban muriendo, como se observó a las 72 hpi.

VIII. CONCLUSIONES

- La vimentina en células MARC-145, mostró un patrón fino en la zona perinuclear con irradiación del centro a la membrana celular en forma de red a nivel citoplásmico.
- Se determinó que los cambios citopáticos en el cultivo se presentaron a partir de las 24 hpi, concluyendo con la destrucción total de la monocapa a las 72 hpi.
- La infección con PRRSv indujo cambios estructurales en el citoesqueleto de vimentina caracterizados por una marca difusa que puede corresponder a despolimerización citoplasmática y aglomerados perinucleares presentes en sincitios y células aisladas.
- Se realizó el manejo, mantenimiento y propagación de la línea celular MARC-145 bajo condiciones específicas de laboratorio.
- Se estandarizó la técnica de inmunofluorescencia con triple marcaje para la visualización del citoesqueleto de vimentina, actina y núcleos en las células MARC-145.

IX. REFERENCIAS

1. Alberts, B., & Bray, D. (2011). Introducción a la biología celular. Ed. Médica Panamericana.
2. Alberts, B., Hopkin, K., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2021). Introducción a la biología celular (5ta ed.) Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2015). Molecular Biology of the Cell (6ta ed.) New York: Garland Science.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Peter, W. (2010). Biología molecular de la célula (5ta ed.) New York: Garland Science.
5. Amador, J. (2016). Evaluación del impacto económico del virus PRRS en granjas porcinas en México. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
6. Battaglia, A. A., Delic, S., Herrmann, H., Snider, N. T. (2022). Vimentin on the move: new developments in cells migration. F100 Research.
7. Boehringer Ingelheim. Ingelvac® PRRS MLV (Ficha técnica) [en línea]. Recuperado el 10 de noviembre del 2022 de <https://www.boehringer-ingelheim.mx/>
8. Cafruny, WA., Ruman, RG., Wong, G., Suleman, S., Ward-Demo, P., Rowland, R., Nelson, EA. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection spreads by cell-to-cell transfer in cultured MARC-145 cells, is dependent on an intact cytoskeleton, and is suppressed by drug-targeting of cell permissiveness to virus infection. Virology Journal, 3:90.
9. Castro, A. (2020). Enfermedades virales exóticas, emergentes y reemergentes en porcinos. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
10. Chang, XB., Yang, YQ., Gao, JC. et al. (Julio, 2018). Annexin A2 binds to vimentin and contributes to porcine reproductive and respiratory syndrome virus multiplication [versión electrónica]. Veterinary Research 49,75.
11. Comunidad Profesional Porcina [en línea]. Recuperado el 8 de octubre del 2022 de www.3tres3.com
12. de Juan, H. J., Fernández, J. E., Ibarra, R. F., & Ribera, C. J. (2022). Biología celular conceptos esenciales. Argentina: Médica Panamericana.

13. Ding, Z., Li, Z., Zhang, X., Liu, C., Zhang, L., Li, Y. (Enero, 2012). Proteomic alteration of Marc-145 cells and PAMs after infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus [versión electrónica]. *Veterinary Immunology and Immunopathology* Vol. 145, pp. 206-213.
14. Döhner K., Sodeik, B. (2004). *The role of cytoskeleton during viral infection*. Springer-Verlag 258: 67-108.
15. Estévez, G. J. (2020). *Implicaciones de la estructura del extremo del microtúbulo en el mecanismo molecular de paclitaxel*. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid.
16. Gómez CF. *Vimentina: características, estructura, funciones y usos*. <https://www.lifeder.com/vimentina/>
17. González, A. (2019). *Caracterización de unidades de producción porcina semitecnificadas mediante la determinación de costos de producción y rentabilidad en México*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
18. Ingelvac PRRS MLV (ficha técnica).
19. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Recuperado el 17 de Marzo del 2023 de la base de datos de ICTV <https://ictv.global/>
20. Jackson, P.G.G., Cockcroft, P.D. (2007). Cap. 11 Polysystemic diseases En *Handbook of pig medicine* (pp. 180-197). China: Saunders Elsevier.
21. Jardon. S. (2020). *Estudio del efecto biológico en líneas celulares de nanopartículas lipídicas y poliméricas como vehículo de ácido glicirricínico para el tratamiento del virus de PRRS*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
22. Joaquín de Juan Herrero, Fernández, E., Ibarra, F., Ribera, J. (2022). *Biología celular conceptos esenciales*. México: Editorial Médica Panamericana.
23. Johnson, N. (2014). Cap.1 A short introduction to disease emergence. En *The role of animals in emerging viral diseases* (pp. 1-19). San Diego, California: Academic Press.
24. Kim, J., Fahad, A., Shanmukhappa, K., Kapil, S. (2006). Defining the Cellular Target(s) of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Blocking Monoclonal Antibody 7G10. (pp. 689-696). Washington, DC. *Journal of Virology*.

25. Kumar, A. (2021). Cap. 1 An introduction to cell culture En *Clinical biochemistry and drug development* (pp. 1-5). Burlington, Ontario: Apple Academic Press.
26. Lázaro, F. (2008). *Implicación de los filamentos de actina en la arquitectura, homeostasis y tráfico de salida del aparato de golgi y estudio de la formación y degradación de un agregoma de actina* Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.
27. Lin, Y. (2015). MARC-145 Cell Culture [versión electrónica]. China Animal Disease Control Center. Recuperado el 22 de junio de 2022 de https://rr-asia.woah.org/wp-content/uploads/2020/06/prrs_4_marc-145-cell-culture-dr-yuan.pdf
28. MacLachlan, N. J. (2017). Cap. 1 The nature of viruses. En *Fenner's Veterinary Virology* (pp. 3-16). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
29. Martínez P, M. J. & Martínez R, M. J. (2010). Revisión sobre filamentos intermedios, con especial referencia a las citoqueratinas. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 4(2).
30. MSD Salud Animal. PRIME PAC® PRRS (Ficha técnica) [en línea]. Recuperado el 10 de noviembre del 2022 de <https://www.msd-salud-animal.mx/>
31. Paniagua, R; Nistal, M; Sesma, P; Álvarez-Uría, M; Fraile, B; Anadón, R; Saéz F. (2017). *La biología celular y molecular*. 4ta edición. Ed. McGraw Hill.
32. Pollard TD & Earnshaw WC. 2019. *Cell Biology*. Saunders Elsevier, 2nd ed. Philadelphia, USA. 2008.
33. Prieto, C., et al. (2017). Síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) En *Enfermedades infecciosas del ganado porcino* (pp. 17-26). España: Servet.
34. Roa, I., Smok, S C, Prieto, G R. (2013). Placenta: Anatomía e Histología Comparada. *International Journal of Morphology* . 30(4):1490–1496.
35. Salceda, R. S., Albert, S. G. (2016). El citoesqueleto: un componente fundamental en la arquitectura y en la fisiología celular. *Revista de Educación Bioquímica* 34 (4): 102-114.
36. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2021). *Panorama Agroalimentario*. Ciudad de México.

37. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020) Panorama Internacional del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino. Recuperado el 6 de abril del 2022, de www.gob.mx/senasica
38. Zhuang, D., Zhi-jie, L. Xiao-dong, Z., Ya-gang, L., Chang-jun, L., Yan-Ping, Z., Yang, L. (2012). Proteomic alteration of Marc-145 cells and PAMs after infections by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 145 206-213. Elsevier.
39. Zimmerman J.J, Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwarts K.J, Stevenson, G.W., Zhang, J. (2019). Cap. 41 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses (Porcine Arteriviruses) En *Diseases of swine* (pp. 685-708). USA: John & Wiley Sons.
40. Zoetis. Foster® PRRS (Ficha técnica) [en línea]. Recuperado el 10 de noviembre del 2022 de <https://www2.zoetis.mx>

X. ANEXOS

ANEXO I

Preparación de medios de cultivo

Medio RPMI al 10% de SFB

10 ml de SFB

0.5 ml penicilina (5000 UI) - estreptomicina (5 µg/ml)

89.5 ml RPMI base

Anexo 2. Elaboración de RPMI al 4%

4 ml de SFB

0.5 ml penicilina (5000 UI) - estreptomicina (5 µg/ml)

95.5 ml RPMI base

Anexo 3. Solución para congelar células

3 ml de medio RPMI

400 µL dimetil sulfoxido (sigma) (DMSO)

1 ml Suero fetal bovino (in vitro)

50 µL Penicilina

ANEXO 2

Estandarización de las concentraciones de trabajo de anticuerpos

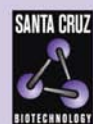
	Concentración
Ac. primario	1:20
Ac. secundario	1:50
Faloidina	1:150

ANEXO 3

Ficha técnica de anticuerpo primario

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Vimentin (V9): sc-6260



The Power to Quantify

BACKGROUND

Cytoskeletal intermediate filaments (IFs) constitute a diverse group of proteins that are expressed in a highly tissue-specific manner. Intermediate filaments are constructed from two-chain, α -helical, coiled-coil molecules arranged on an imperfect helical lattice and have been widely used as markers for distinguishing individual cell types within a tissue and identifying the origins of metastatic tumors. One such intermediate filament protein, Vimentin, is a general marker of cells originating in the mesenchyme. Vimentin is frequently coexpressed with other members of the intermediate filament family, such as the cytokeratins, in neoplasms including melanoma and breast carcinoma.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: VIM (human) mapping to 10p13; Vim (mouse) mapping to 2 A1.

SOURCE

Vimentin (V9) is a mouse monoclonal antibody raised against purified Vimentin from eye lens of porcine origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 μ g IgG₁ kappa light chain in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Vimentin (V9) is available conjugated to agarose (sc-6260 AC), 500 μ g/0.25 ml agarose in 1 ml, for IP; to HRP (sc-6260 HRP), 200 μ g/ml, for WB, IHC(P) and ELISA; to either phycoerythrin (sc-6260 PE), fluorescein (sc-6260 FITC), Alexa Fluor[®] 488 (sc-6260 AF488), Alexa Fluor[®] 546 (sc-6260 AF546), Alexa Fluor[®] 594 (sc-6260 AF594) or Alexa Fluor[®] 647 (sc-6260 AF647), 200 μ g/ml, for WB (RGB), IF, IHC(P) and FCM; and to either Alexa Fluor[®] 680 (sc-6260 AF680) or Alexa Fluor[®] 790 (sc-6260 AF790), 200 μ g/ml, for Near-Infrared (NIR) WB, IF and FCM.

In addition, Vimentin (V9) is available conjugated to either TRITC (sc-6260 TRITC, 200 μ g/ml), PerCP (sc-6260 PerCP), PerCP-Cy5.5 (sc-6260 PCPC5) or Alexa Fluor[®] 405 (sc-6260 AF405), 100 tests in 2 ml, for IF, IHC(P) and FCM.

APPLICATIONS

Vimentin (V9) is recommended for detection of Vimentin of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 μ g per 100-500 μ g of total protein (1 ml of cell lysate)], immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500), immunohistochemistry (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and flow cytometry (1 μ g per 1 x 10⁶ cells). Vimentin (V9) is also recommended for detection of Vimentin in additional species, including porcine.

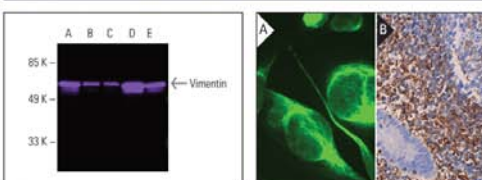
Suitable for use as control antibody for Vimentin siRNA (h): sc-29522, Vimentin siRNA (m): sc-29523, Vimentin siRNA (r): sc-156015, Vimentin shRNA Plasmid (h): sc-29522-SH, Vimentin shRNA Plasmid (m): sc-29523-SH, Vimentin shRNA Plasmid (r): sc-156015-SH, Vimentin shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-29522-V, Vimentin shRNA (m) Lentiviral Particles: sc-29523-V and Vimentin shRNA (r) Lentiviral Particles: sc-156015-V.

Molecular Weight of Vimentin: 57 kDa.

STORAGE

Store at 4° C, **DO NOT FREEZE**. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

DATA



Vimentin (V9): sc-6260. Fluorescent western blot analysis of Vimentin expression in U-251-MG (A), Jurkat (B), HeLa (C), A-10 (D) and K562 (E) whole cell lysates. Blocked with UltraCruz[®] Blocking Reagent; sc-516214. Detection reagent used: m-IgGx BP-CFL 555; sc-516177.

Vimentin (V9) FITC: sc-6260 FITC. Direct immunofluorescence staining of formalin-fixed SW480 cells showing cytoskeletal localization. Blocked with UltraCruz[®] Blocking Reagent; sc-516214 (A). Vimentin (V9): sc-6260. Immunoperoxidase detection of vimentin in formalin fixed, paraffin-embedded human appendix tissue showing cytoplasmic and membrane staining of lymphoid cells and endothelial cells. Detection reagent used: m-IgGx BP-HRP; sc-516102 (B).

SELECT PRODUCT CITATIONS

- Guo, Z., et al. 1998. Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell* 94: 537-548.
- Elliott, G.C., et al. 2014. Foramen ovale closure is a process of endothelial-to-mesenchymal transition leading to fibrosis. *PLoS ONE* 9: e107175.
- Wee, Z.N., et al. 2015. IRAK1 is a therapeutic target that drives breast cancer metastasis and resistance to paclitaxel. *Nat. Commun.* 6: 8746.
- Liu, S., et al. 2016. Fluid shear stress induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) in Hep-2 cells. *Oncotarget* 7: 32876-32892.
- Peuhu, E., et al. 2017. Epithelial vimentin plays a functional role in mammary gland development. *Development* 144: 4103-4113.
- Lin, M., et al. 2018. Overexpression of FOXA1 inhibits cell proliferation and EMT of human gastric cancer AGS cells. *Gene* 642: 145-151.
- Jeong, Y.J., et al. 2019. Bee venom suppresses EGF-induced epithelial-mesenchymal transition and tumor invasion in lung cancer cells. *Am. J. Chin. Med.* 47: 1869-1883.
- Omar, A., et al. 2020. Soyasapogenol-A targets CARF and results in suppression of tumor growth and metastasis in p53 compromised cancer cells. *Sci. Rep.* 10: 6323.
- Gunjigake, K., et al. 2021. Interleukin-17A derived from mast cells contributes to fibrosis in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric Cancer* 24: 31-44.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

Alexa Fluor[®] is a trademark of Molecular Probes, Inc., Oregon, USA

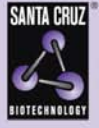
Santa Cruz Biotechnology, Inc. 1.800.457.3801 831.457.3800 fax 831.457.3801 Europe +00800 4573 8000 49 6221 4503 0 www.scbt.com

ANEXO 4

Ficha técnica de anticuerpo secundario

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

goat anti-mouse IgG-FITC: sc-2010



The Power to Quantify

BACKGROUND

Santa Cruz Biotechnology's secondary antibodies are available conjugated to either an enzyme, biotin or fluorophore for use in a variety of antibody-based applications including Western Blot, immunostaining, flow cytometry and ELISA. Secondary antibodies are commonly affinity purified against immobilized whole IgG or against antibody fragments. Santa Cruz Biotechnology offers an extensive selection of secondary antibodies optimized for immunohistochemistry and flow cytometry, and are labeled with either biotin, FITC (fluorescein isothiocyanate), Texas Red[®], TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate), PE (phycoerythrin), PerCP (peridinin chlorophyll protein complex) and PerCP-Cy5.5 (peridinin chlorophyll protein complex with cyanin-5.5). Immunohistochemistry and flow cytometry secondary antibodies are specific for commonly used primary antibody species, including goat, rabbit, mouse and rat.

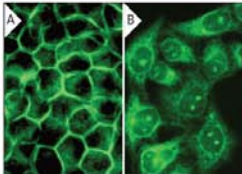
STORAGE

Store at 4° C, ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

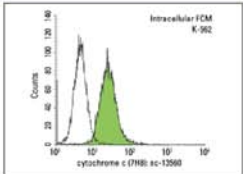
SOURCE

goat anti-mouse IgG-FITC is a pre-adsorbed, affinity purified secondary antibody raised in goat against mouse IgG and conjugated to FITC (fluorescein isothiocyanate).

DATA



goat anti-mouse IgG-FITC: sc-2010. Immunofluorescence staining of methanol-fixed HeLa cells showing membrane (A) and cytoskeletal (B) localization. Antibodies tested: Annexin II (C-10): sc-28395 (A) and WIP (A-7): sc-271113 (B).



goat anti-mouse IgG-FITC: sc-2010. Indirect, intracellular FCM analysis of fixed and permeabilized K-562 cells stained with cytochrome c (7H8), followed by FITC-conjugated goat anti-mouse IgG: sc-2010. Black line histogram represents the isotype control, normal mouse IgG_{2a}: sc-3879. Antibody tested: cytochrome c (7H8): sc-13560.

PRODUCT

Each vial contains 200 µg goat IgG (pre-adsorbed with human IgG) in 0.5 ml of either PBS containing 0.02% sodium azide (for IF) or PBS containing 0.1% gel and 0.1% sodium azide (for FCM).

SELECT PRODUCT CITATIONS

1. de Roziere, S., et al. 2000. The loss of mdm2 induces p53 mediated apoptosis. *Oncogene* 19: 1691-1697.
2. Pascucci, L., et al. 2011. Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: towards the definition of minimal stemness criteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144: 499-506.
3. Mazumder Indra, D., et al. 2011. Inactivation of CHEK1 and El24 is associated with the development of invasive cervical carcinoma: clinical and prognostic implications. *Int. J. Cancer* 129: 1859-1871.
4. Rubert, J., et al. 2011. Bim and Mcl-1 exert key roles in regulating JAK2V617F cell survival. *BMC Cancer* 11: 24.
5. Lin, C.Y., et al. 2011. Real-time detection of β1 integrin expression on MG-63 cells using electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 28: 221-226.
6. Huang, Y., et al. 2011. PML-RARα enhances constitutive autophagic activity through inhibiting the Akt/mTOR pathway. *Autophagy* 7: 1132-1144.
7. Karaoz, E., et al. 2012. Reduction of lesion in injured rat spinal cord and partial functional recovery of motility after bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation. *Turk Neurosurg.* 22: 207-217.
8. Zeng, Wang., et al. 2012. Dihydroartemisinin induces autophagy and inhibits the growth of iron-loaded human myeloid leukemia K562 cells via ROS toxicity. *FEBS Open Bio.* 2: 103-112.
9. Cortés, R., et al. 2012. Differences in MEF2 and NFAT transcriptional pathways according to human heart failure aetiology. *PLoS ONE* 7: e30915.

RECOMMENDED SUPPORT PRODUCTS

A. TISSUE CULTURE CELLS

- CrystalCruz™ Cover Glasses, 22 x 50 mm, precleaned: sc-24975
- CrystalCruz™ Micro Slides 75 x 25 mm; 72 frosted sides: sc-24976
- PBS (Phosphate Buffered Saline), powder, 1 packet: sc-24947
- Formaldehyde, 37% formaldehyde solution, 25 ml: sc-203049
- Hydrogen Peroxide, 30% solution, 100 ml: sc-203336

B. FROZEN TISSUE SECTIONS

- Organo/Limonene Mount, non-toxic alternative to Permount, 100 ml: sc-45087
- UltraCruz™ Mounting Medium, aqueous-based, 10 ml: sc-24941
- ImmunoHistoMount, aqueous-based mounting medium, 30 ml: sc-45086
- Immuno *In Situ* Mount, for use with *in situ* hybridization, 30 ml: sc-45088

C. FORMALIN-FIXED, PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE SECTIONS

- Paraffin, for the preparation of tissue samples for staining, 500 g: sc-286633
- Xylenes, mixed isomers with ethylbenzene, 500 ml: sc-237422
- Hematoxylin, Gill's Formulation #2; nuclear counter stain, 100 ml: sc-24973

Texas Red[®] is a registered trademark of Molecular Probes (6/02).

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

Santa Cruz Biotechnology, Inc. 1.800.457.3801 831.457.3800 fax 831.457.3801 Europe +00800 4573 8000 49 6221 4503 0 www.scbt.com

49

ANEXO 5

Detalles de figuras

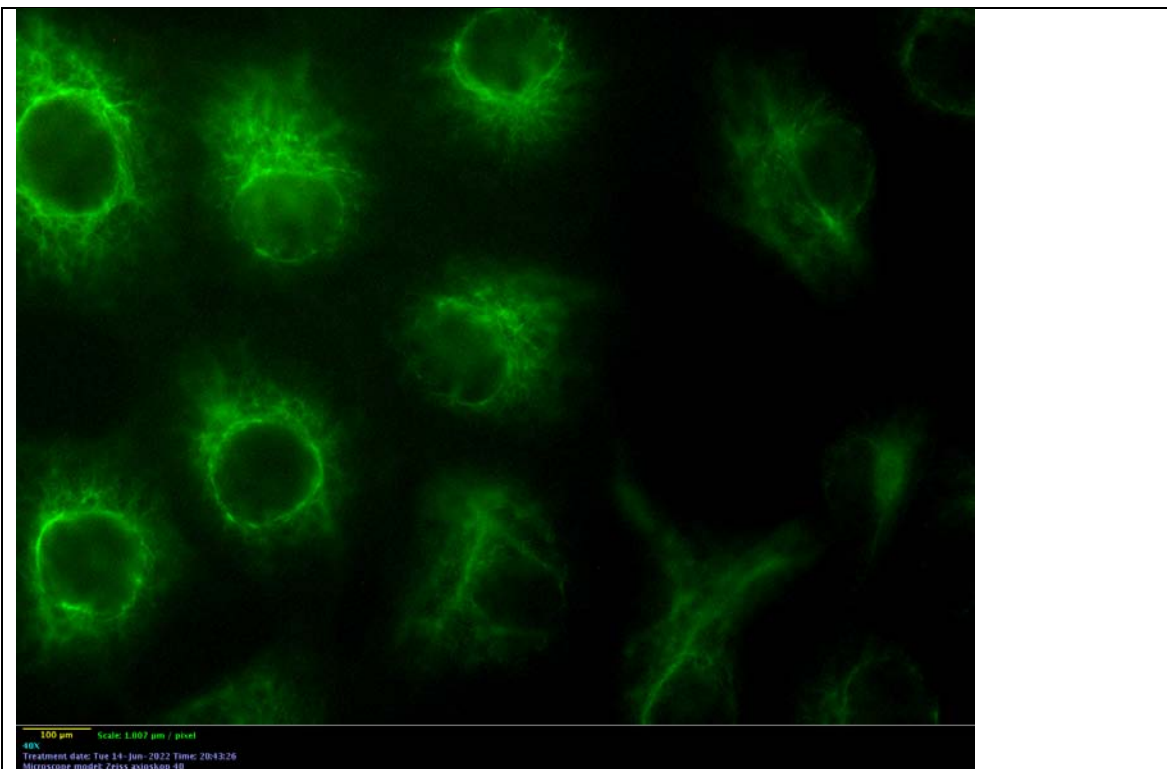


Fig. 9 Fotomicrografías de fluorescencia en células MARC-145. (A) Vimentina 40X

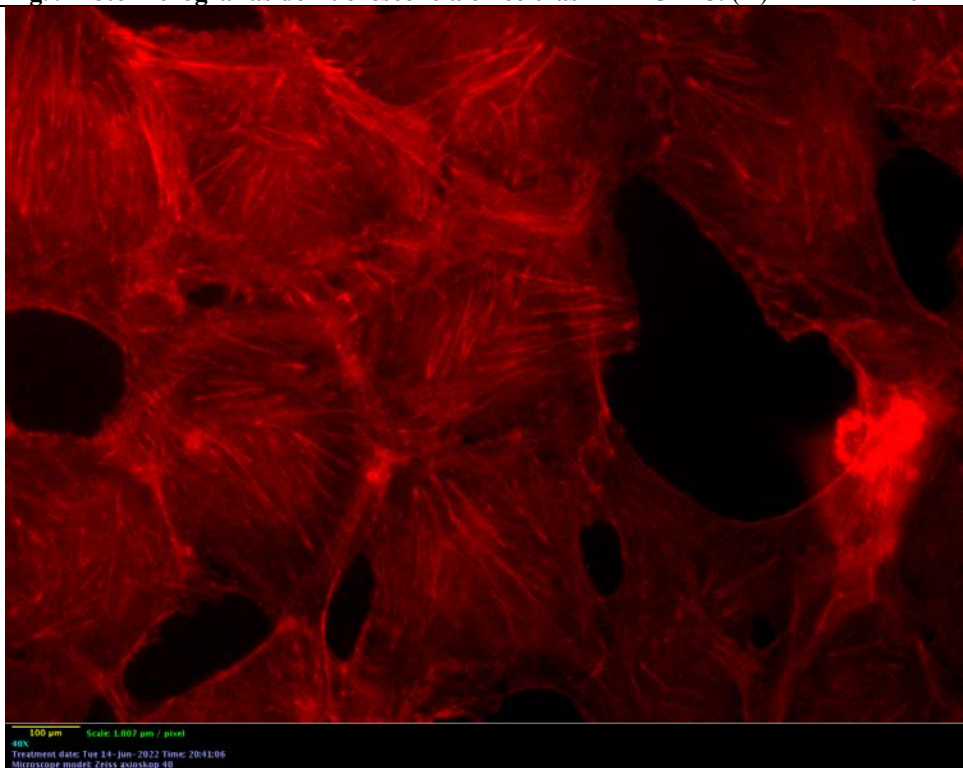


Fig. 9 Fotomicrografías de fluorescencia en células MARC-145. (B) Actina 40X

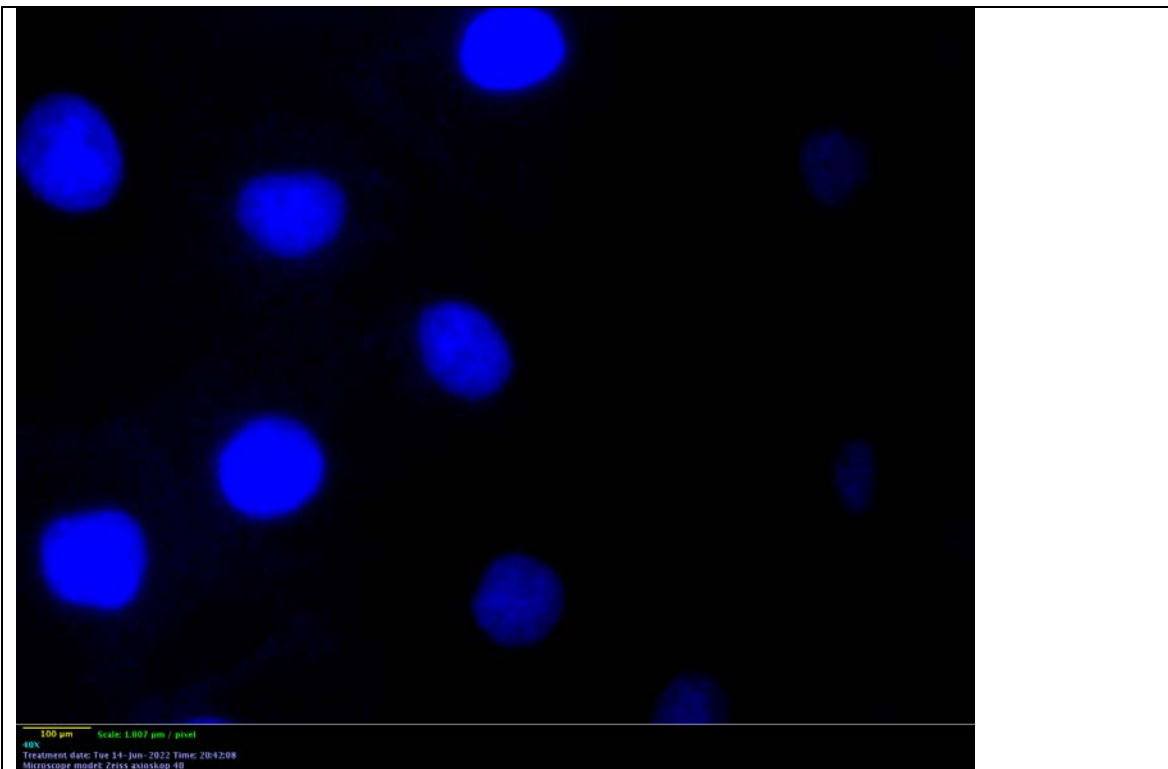


Fig. 9 Fotomicrografías de fluorescencia en células MARC-145. (C) DAPI 40X

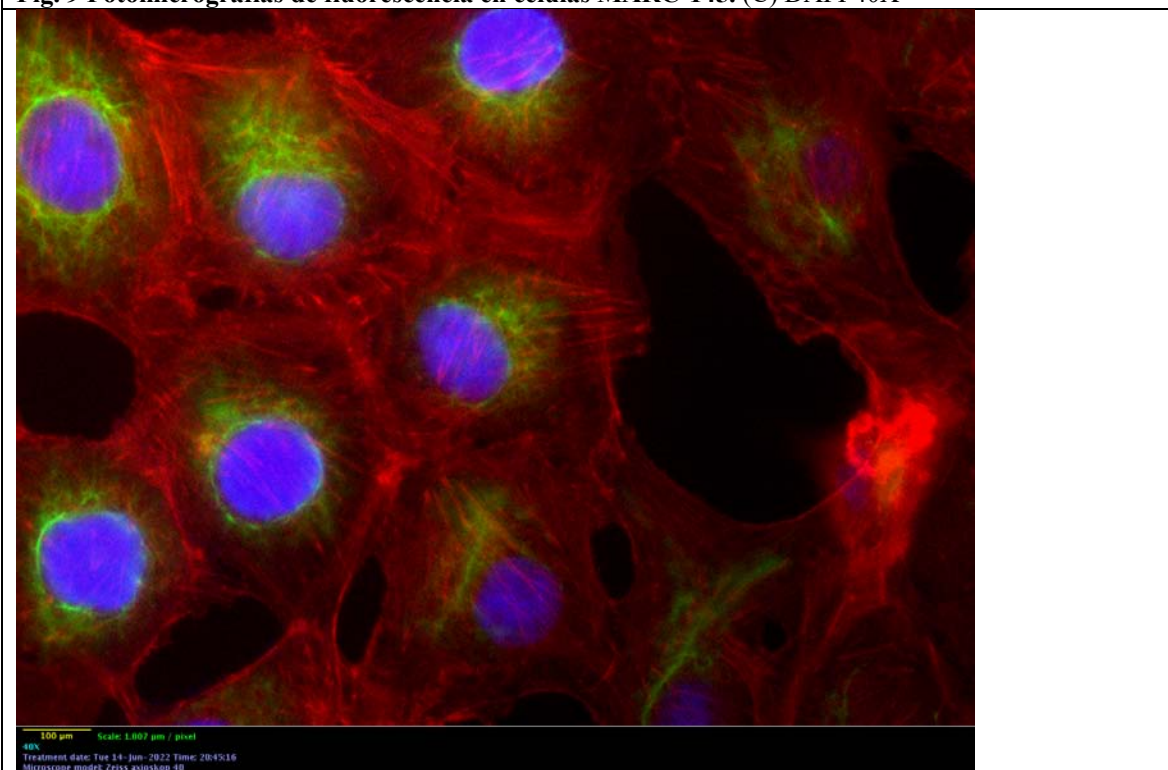


Fig. 9 Fotomicrografías de fluorescencia en células MARC-145. (A) Merge 40X

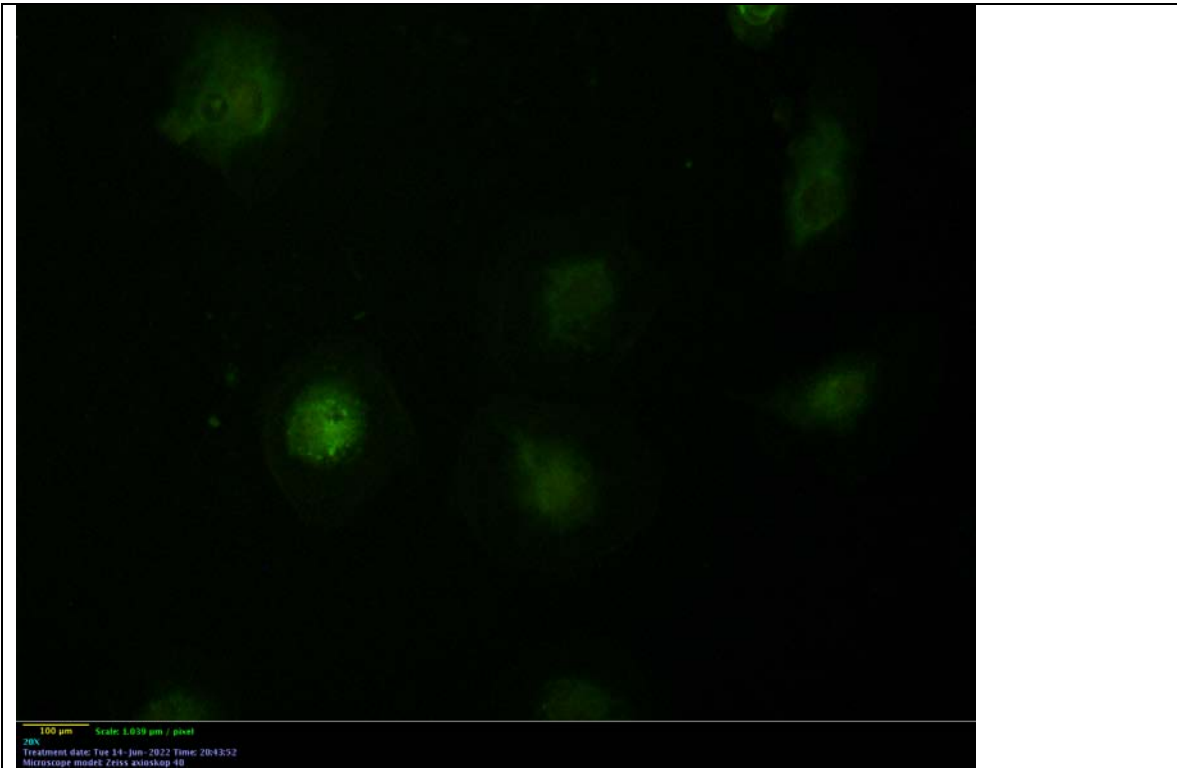


Fig. 10 Cultivos de la línea celular MARC-145 control. (A-1) Vimentina 40X

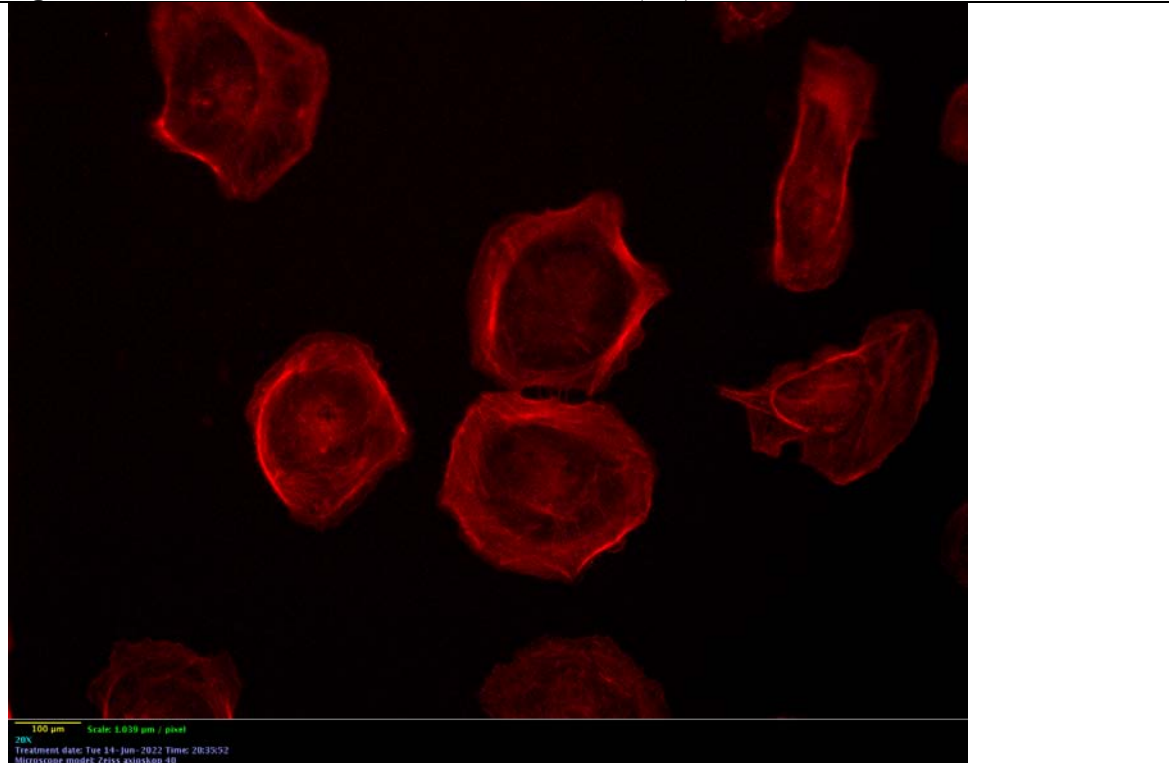


Fig. 10 Cultivos de la línea celular MARC-145 control. (B-1) Actina 40X

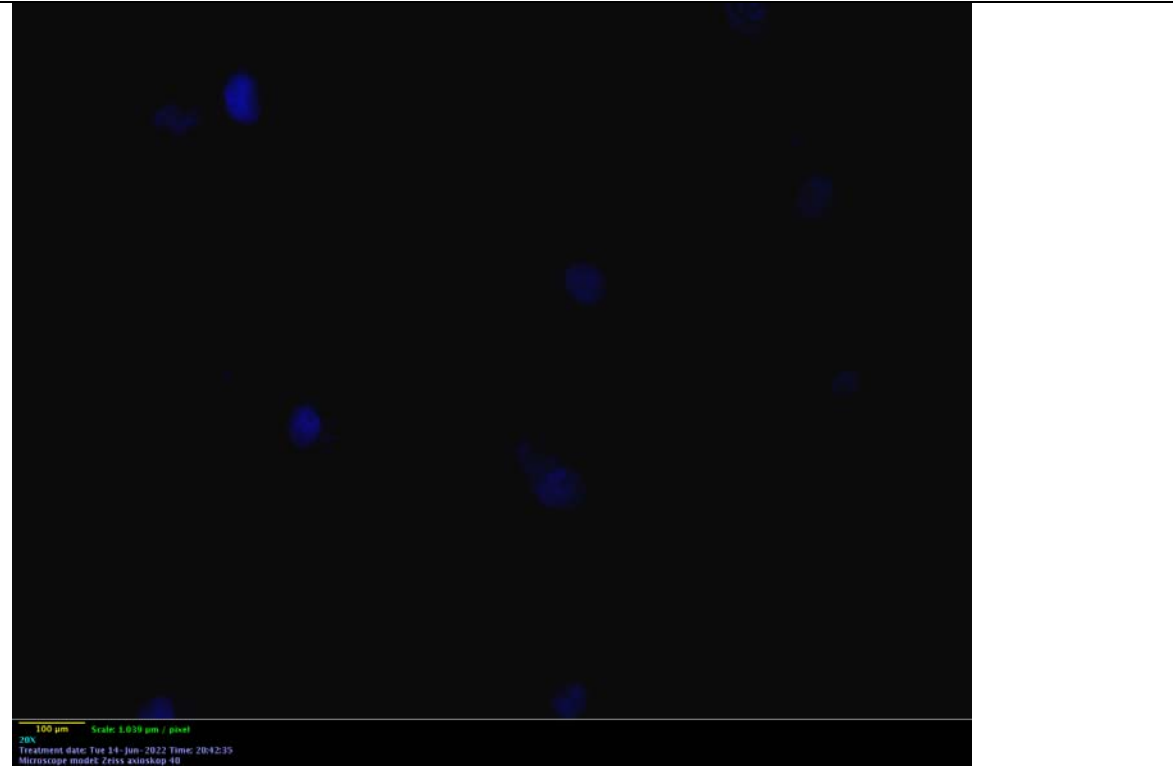


Fig. 10 Cultivos de la línea celular MARC-145 control. (C-1) DAPI 40X

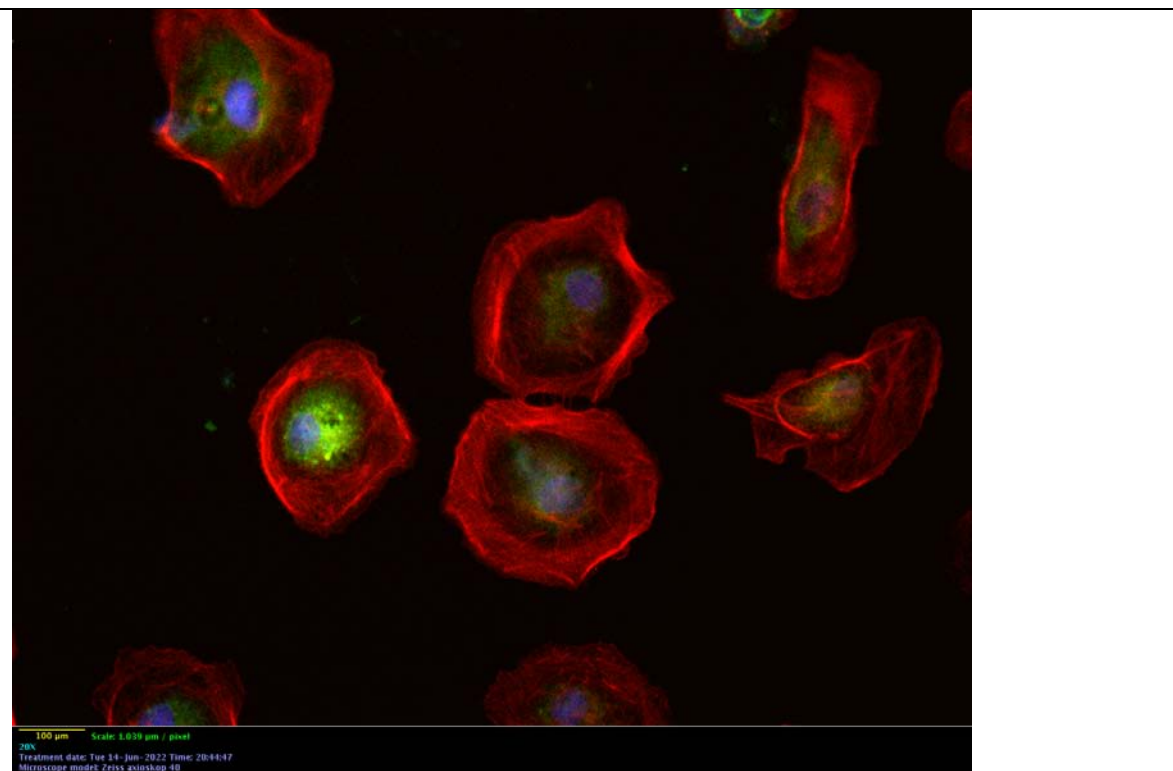


Fig. 10 Cultivos de la línea celular MARC-145 control. (D-1) Merge 40X

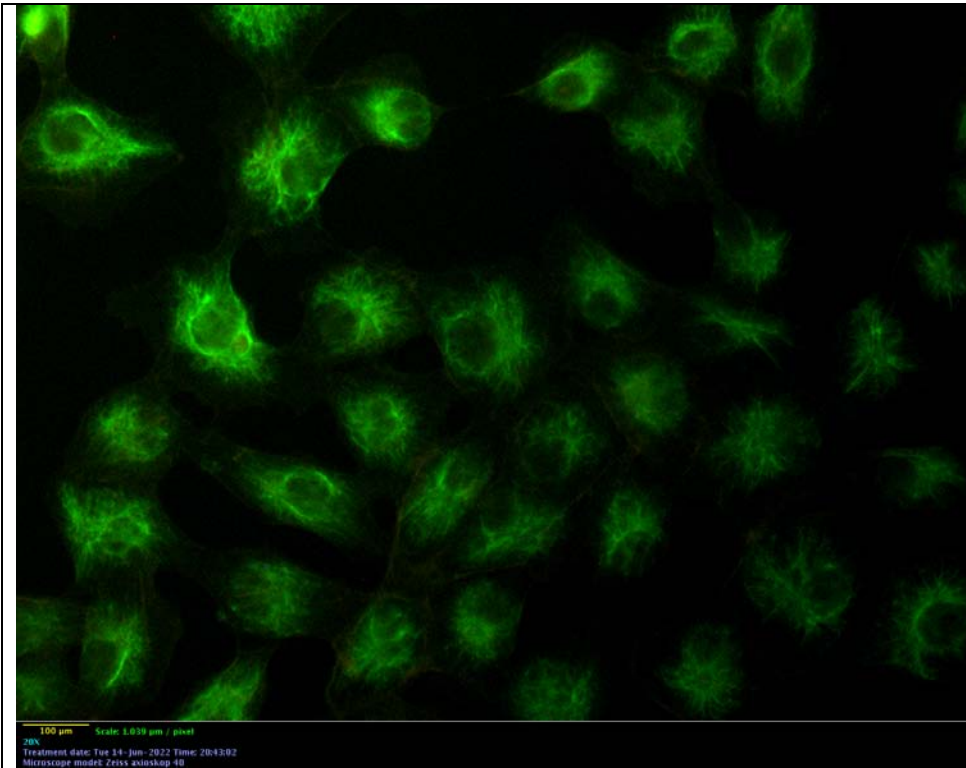


Fig. 10 Cultivos de la línea celular MARC-145 control. (A-2) Vimentina 40X

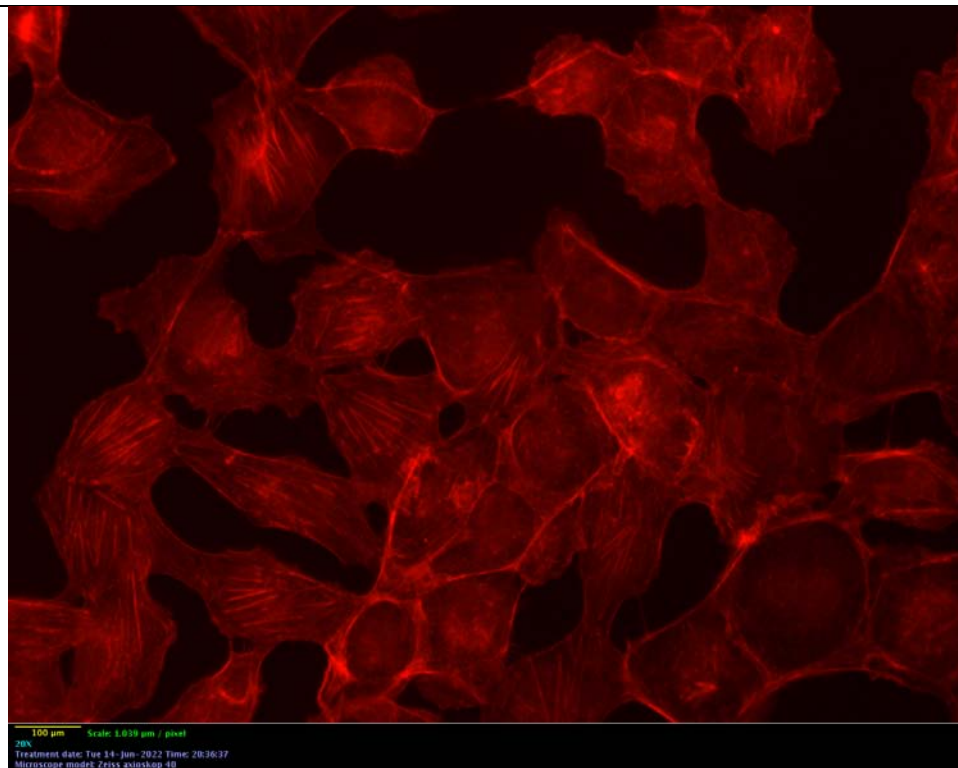


Fig. 10 Cultivos de la línea celular MARC-145 control. (B-2) Actina 40X

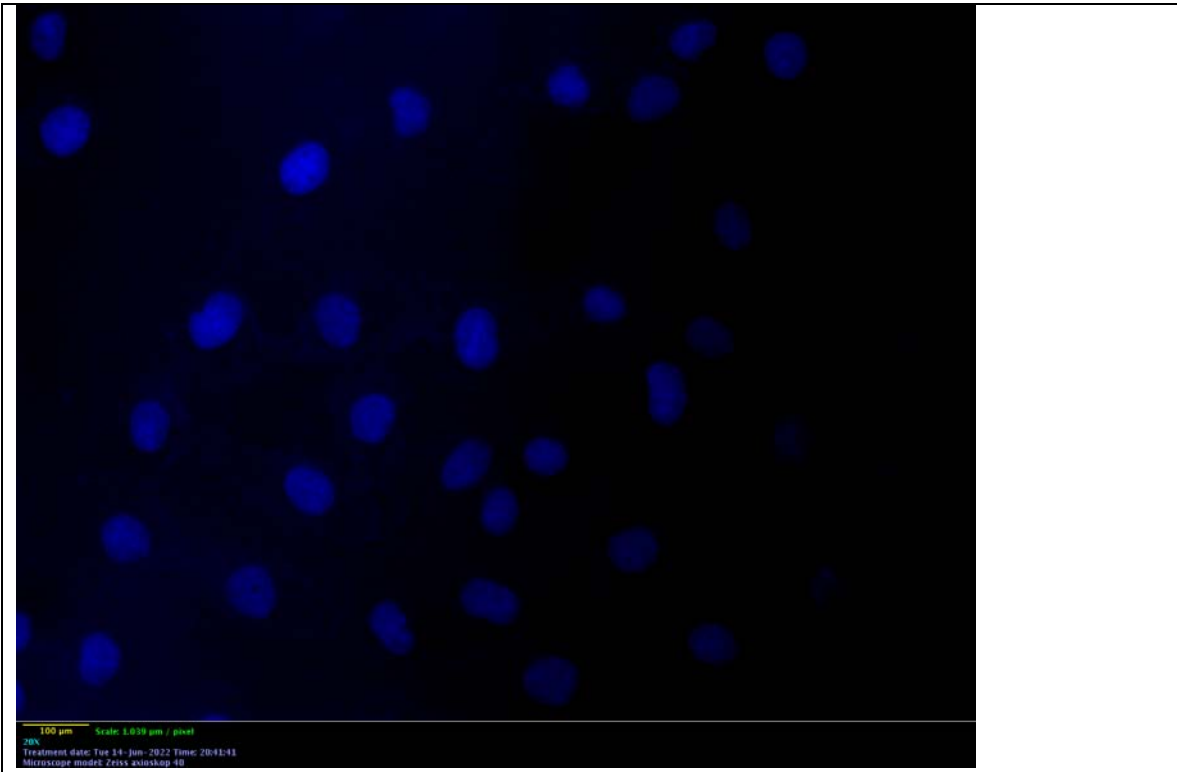


Fig. 10 Cultivos de la línea celular MARC-145 control. (C-2) DAPI 40X

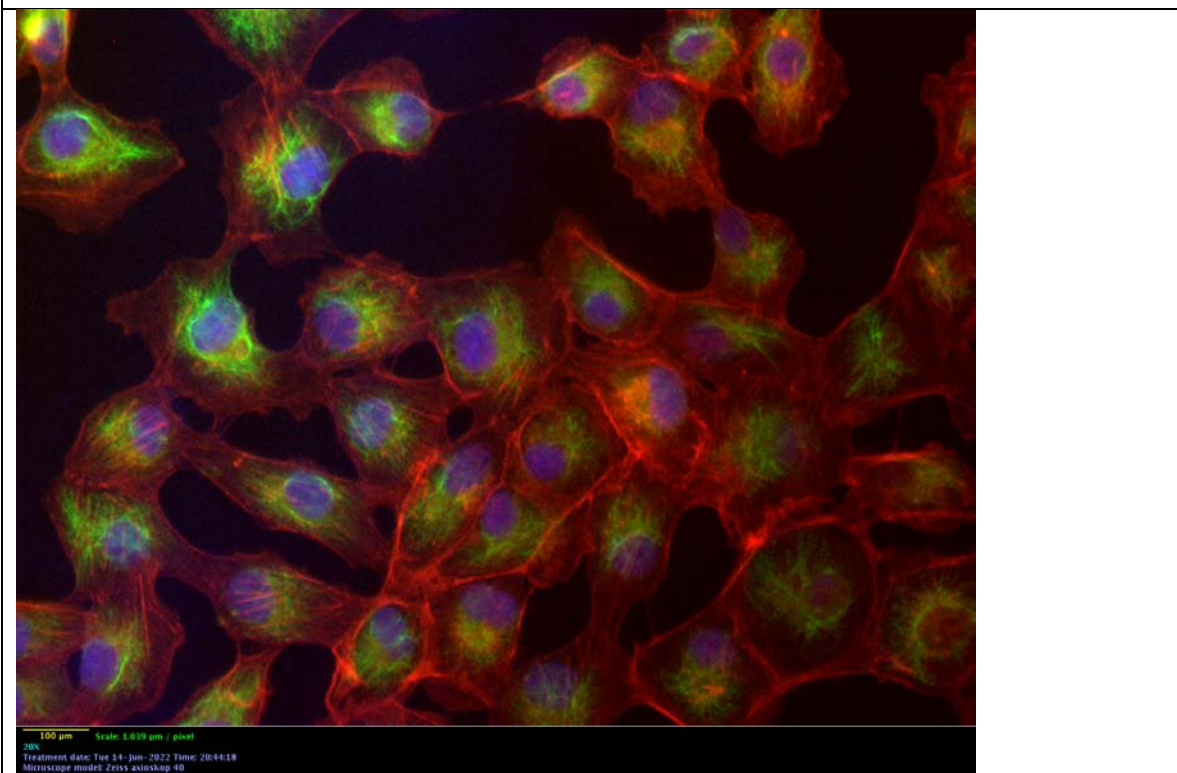


Fig. 10 Cultivos de la línea celular MARC-145 control. (D-2) Merge 40X

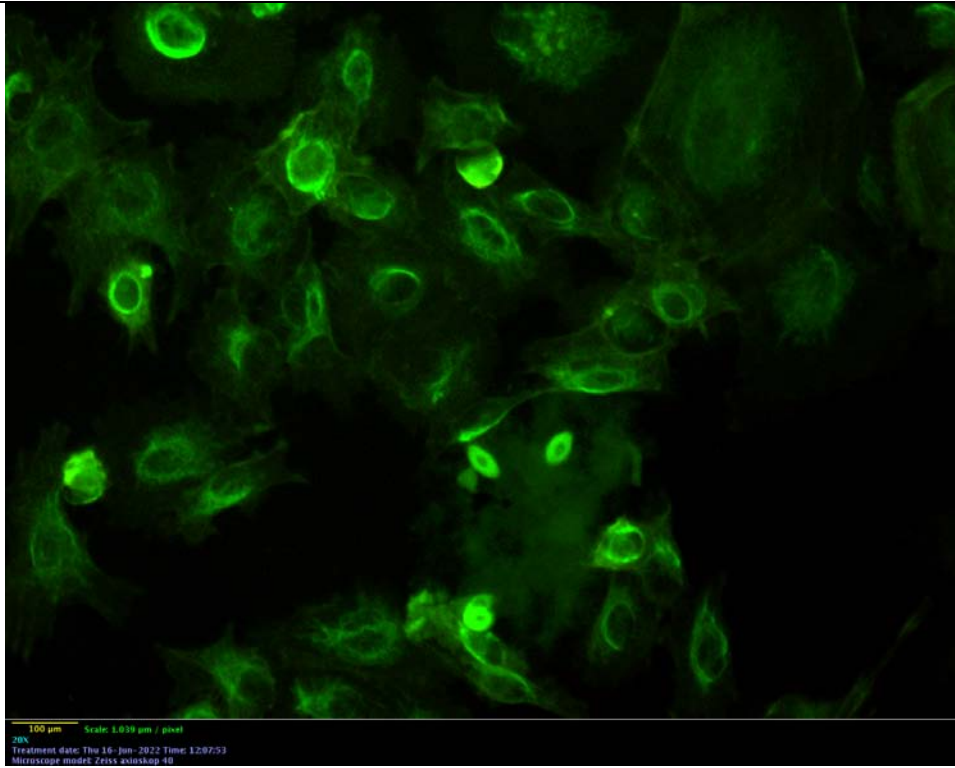


Fig. 11 Agregados perinucleares MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi. (A) Vimentina 20X

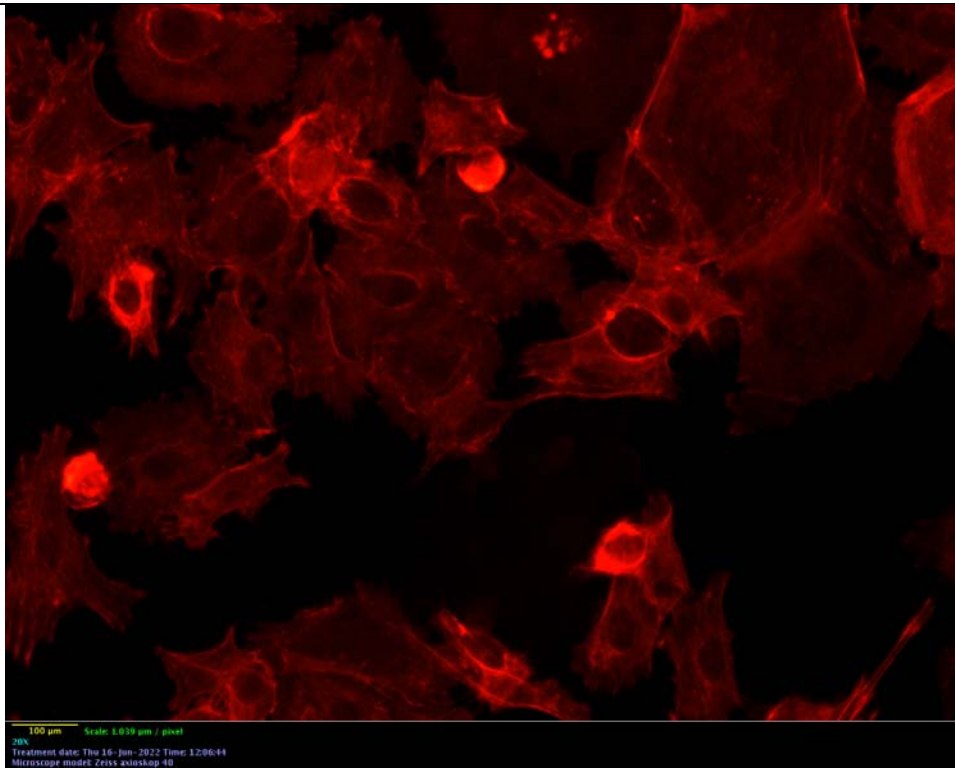


Fig. 11 Agregados perinucleares MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi. (B) Actina 20X

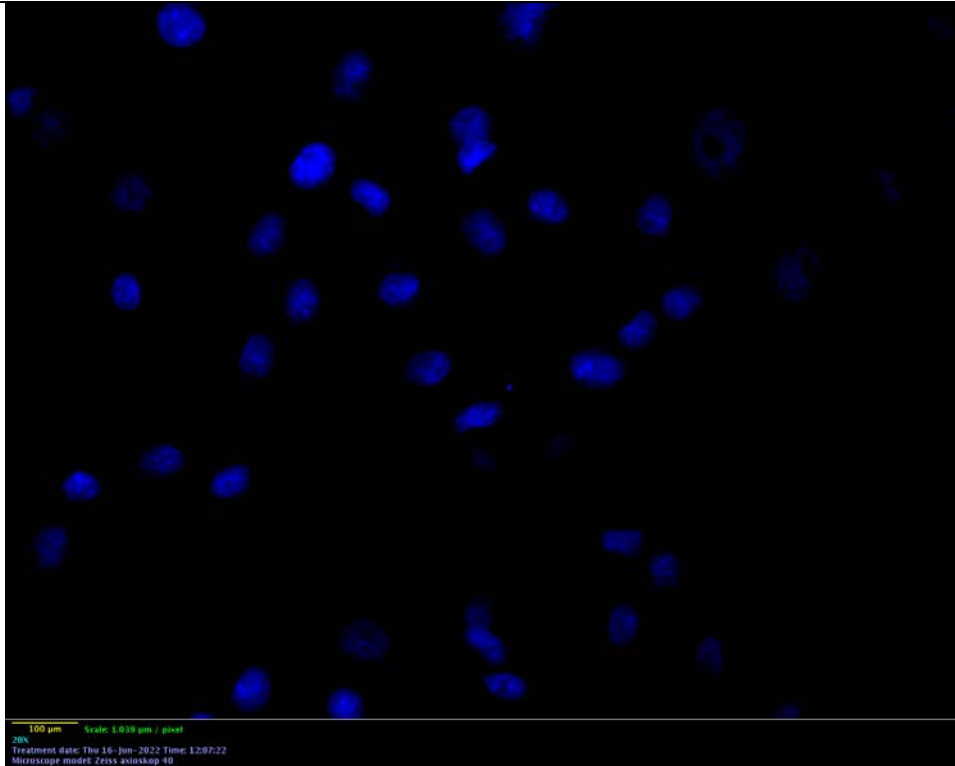


Fig. 11 Agregados perinucleares MARC-145 infectadas con PRRSV a las 24 hpi. (C) DAPI 20X

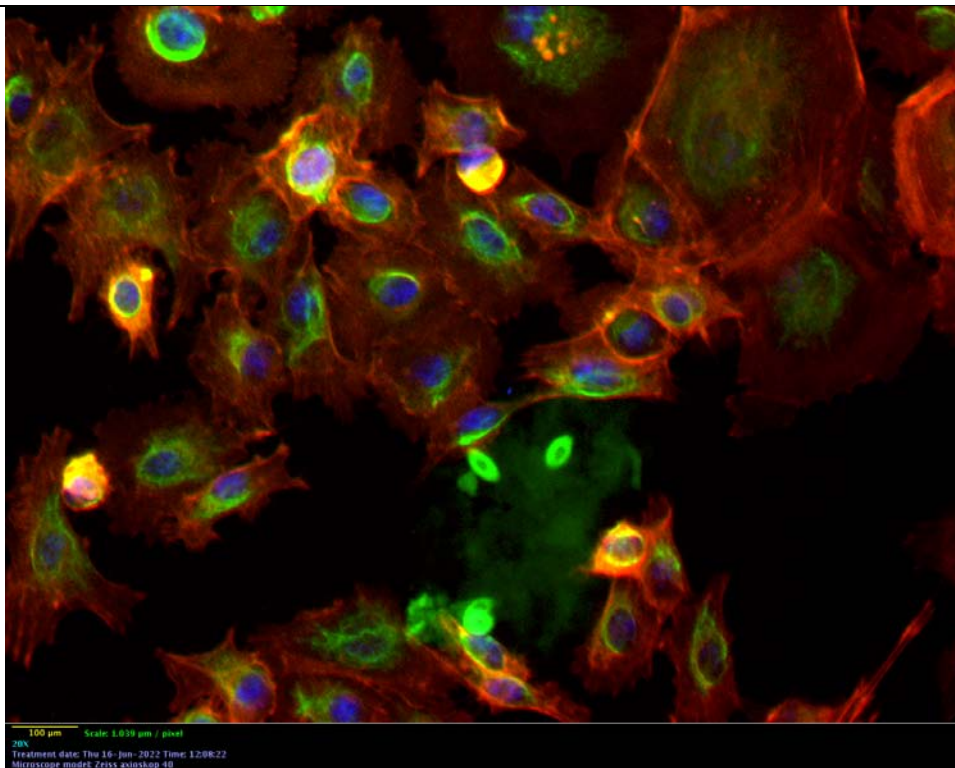


Fig. 11 Agregados perinucleares MARC-145 infectadas con PRRSV a las 24 hpi. (D) Merge 20X

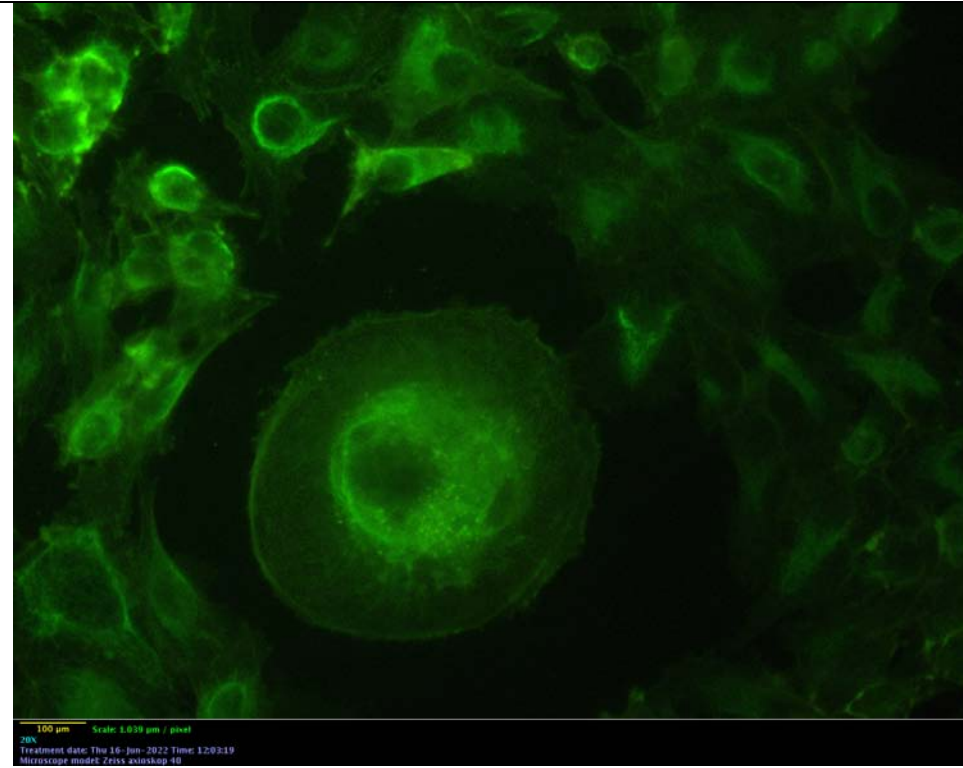


Fig. 12 Células gigantes MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi. (A) Vimentina 20X

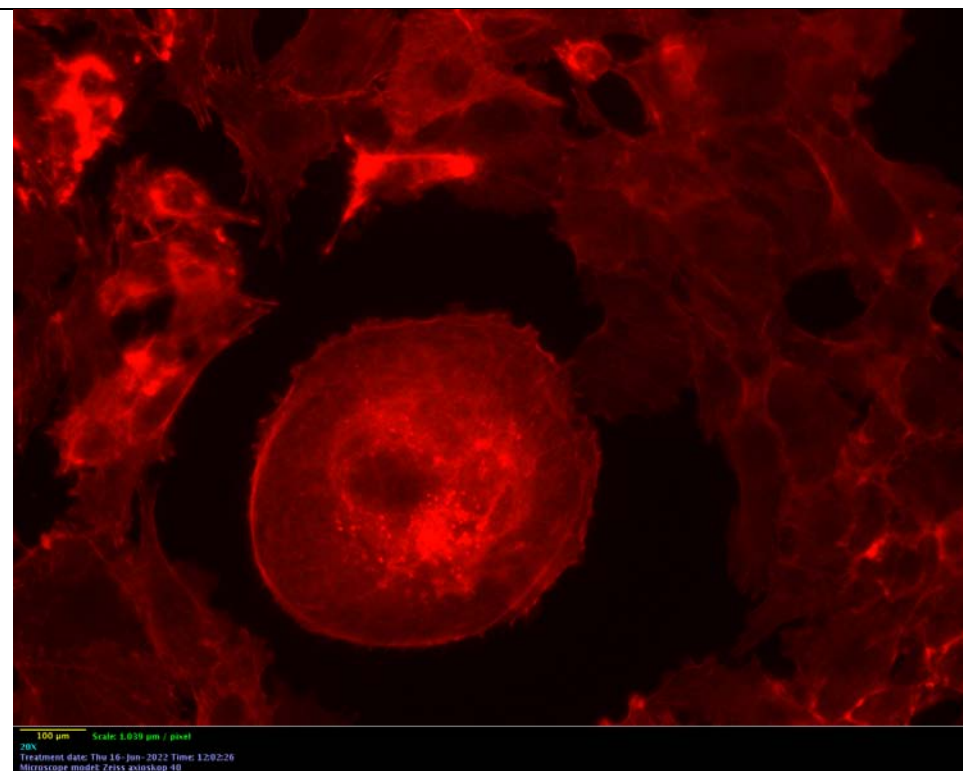


Fig. 12 Células gigantes MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi. (B) Actina 20X

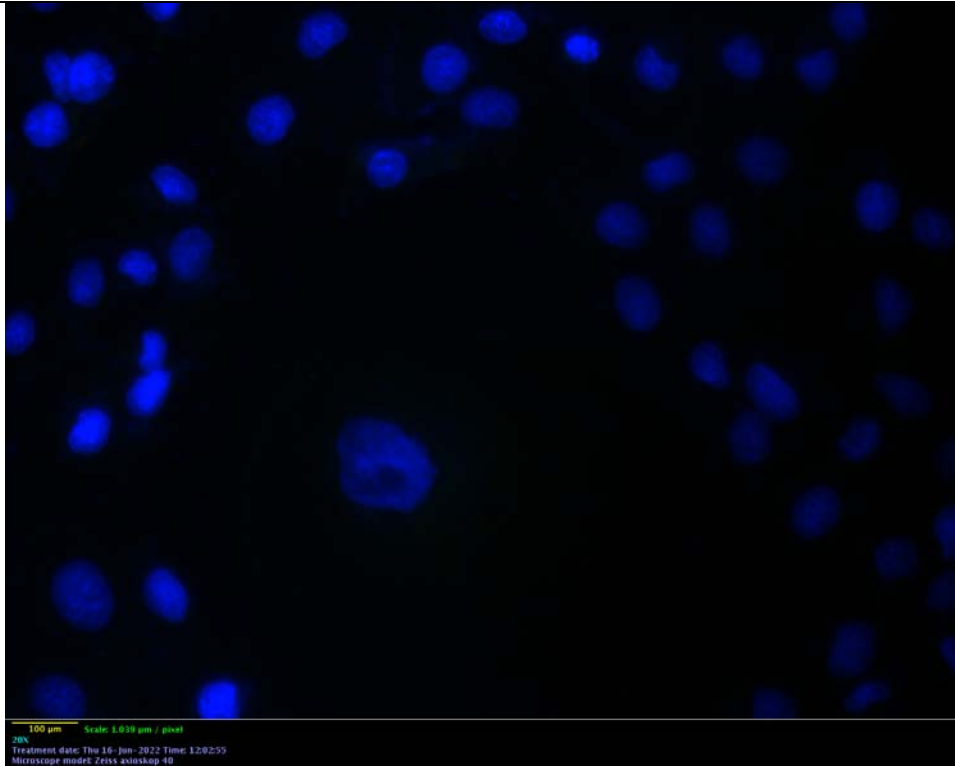


Fig. 12 Células gigantes MARC-145 infectadas con PRRSV a las 24 hpi. (C) DAPI 20X

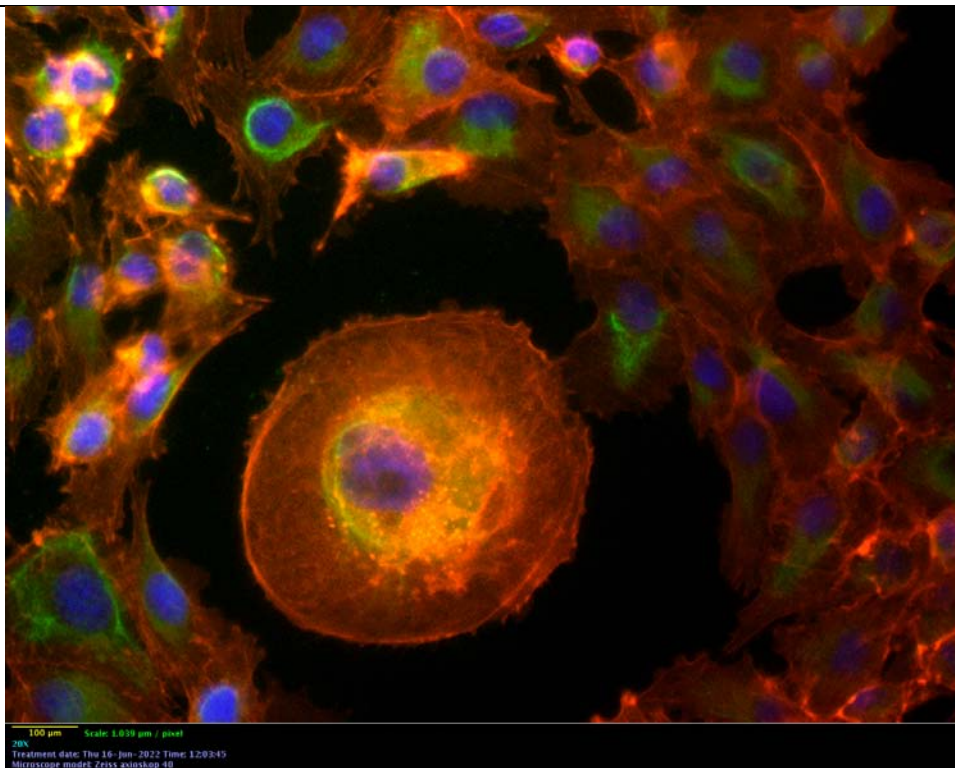


Fig. 12 Células gigantes MARC-145 infectadas con PRRSV a las 24 hpi. (D) Merge 20X

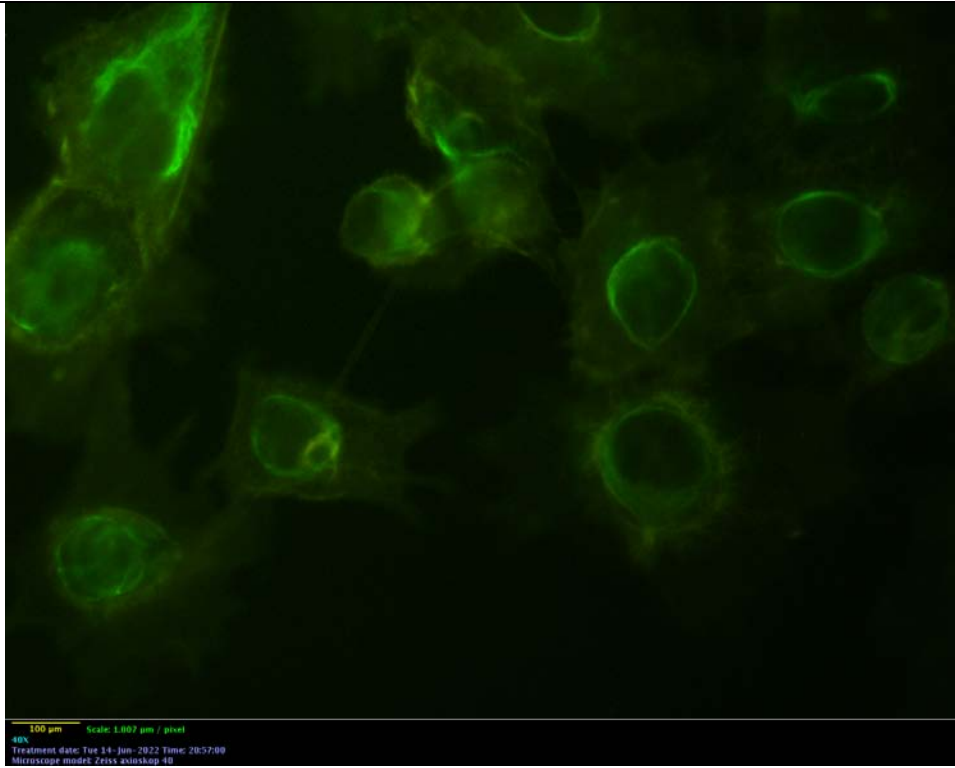


Fig. 13 Filopodios MARC-145 infectadas con PRRSV a las 24 hpi. (A) Vimentina 40X

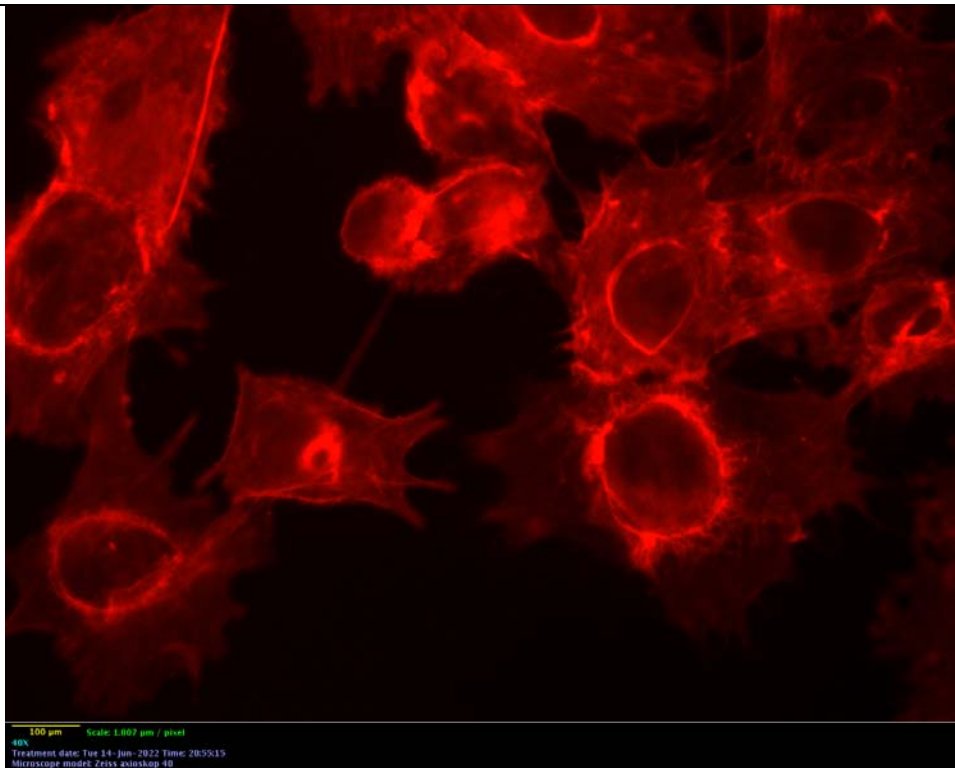


Fig. 13 Filopodios MARC-145 infectadas con PRRSV a las 24 hpi. (B) Actina 40X

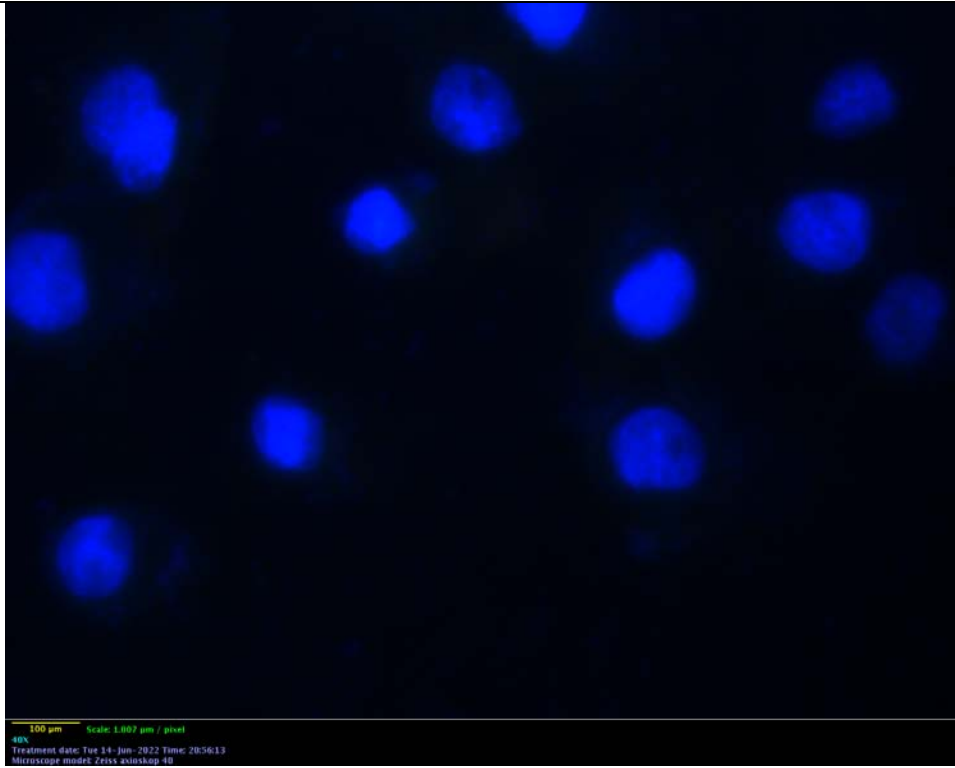


Fig. 13 Filopodios MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi. (C) DAPI 40X

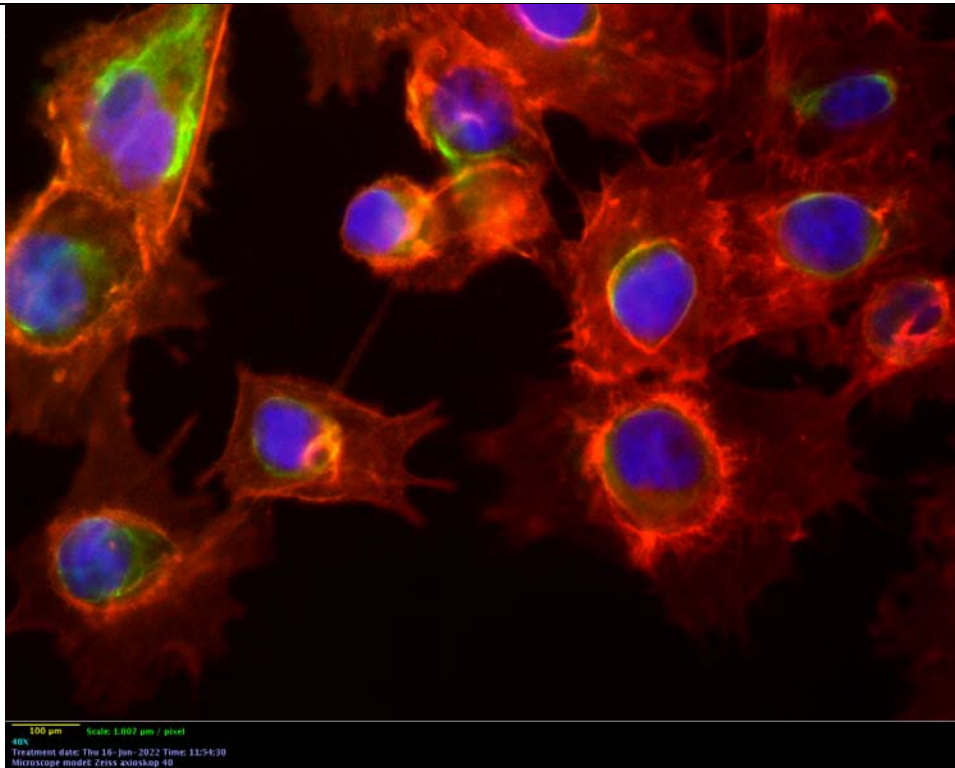


Fig. 13 Filopodios MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi. (D) Merge 40X

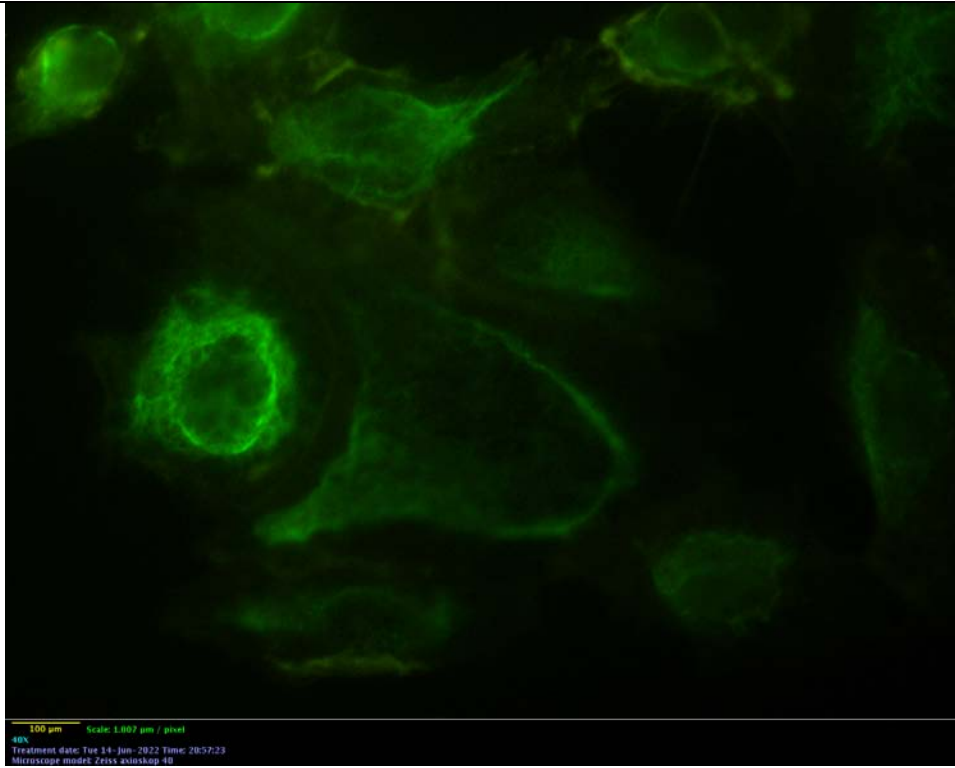


Fig. 14 Sincitios MARC-145 infectadas con PRRSv a Las 24 hpi. (A) Vimentina 40X

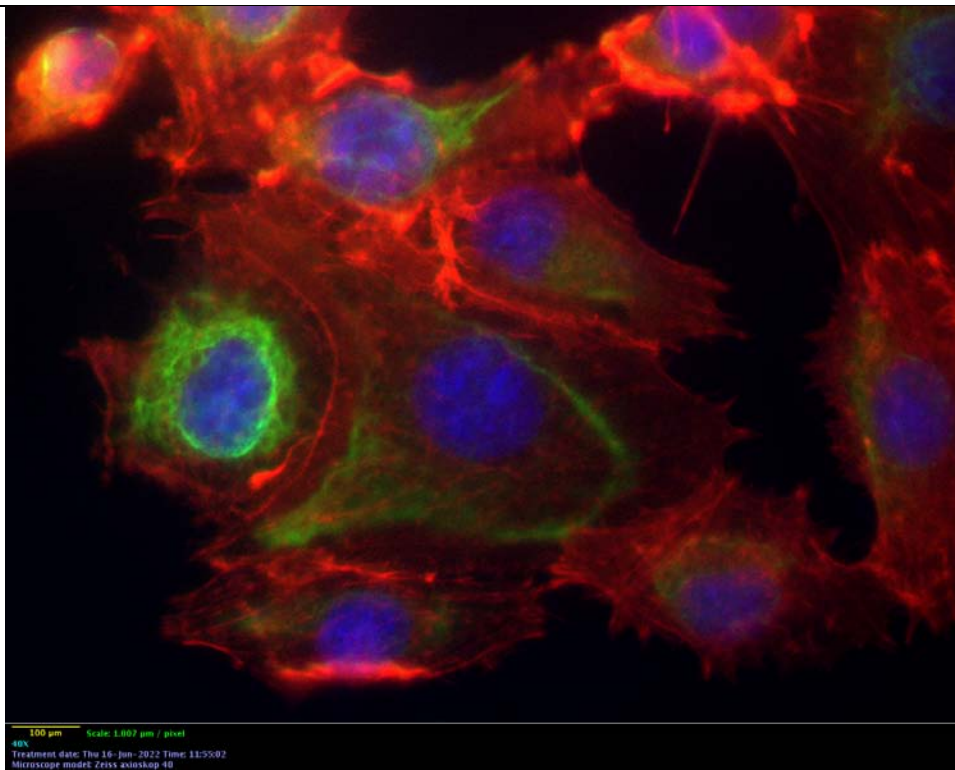


Fig. 14 Sincitios MARC-145 infectadas con PRRSv a las 24 hpi. (B) Merge 40X

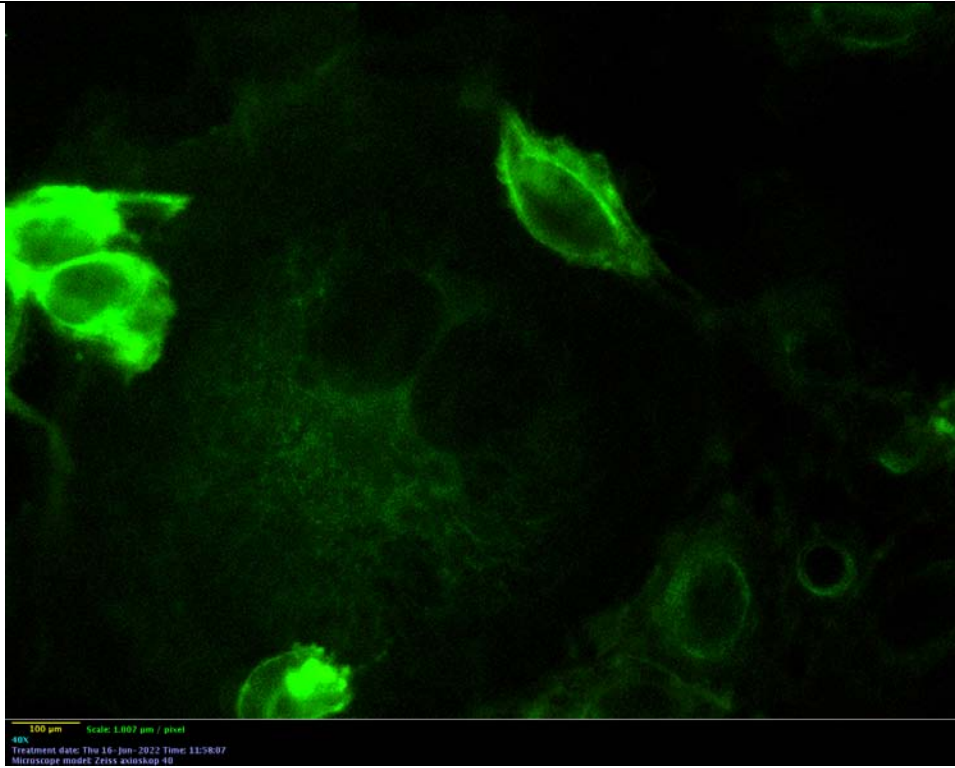


Fig. 14 Sincitios MARC-145 infectadas con PRRSv a ñas 24 hpi. (C) Vimentina 40X

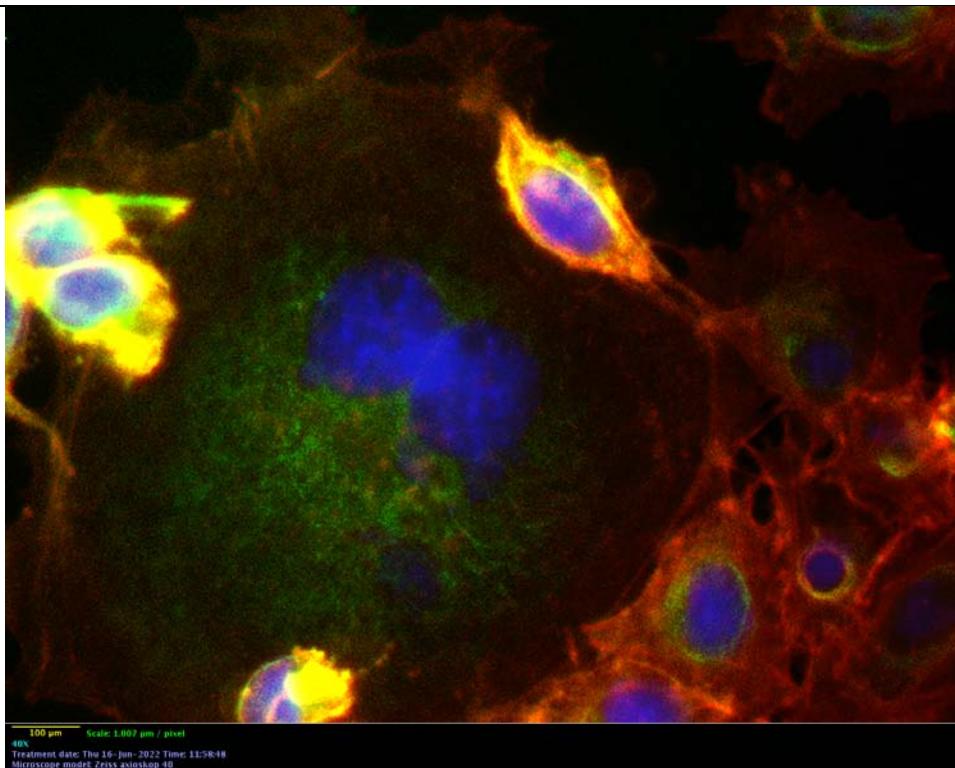


Fig. 14 Sincitios MARC-145 infectadas con PRRSv a ñas 24 hpi. (D) Merge 40X

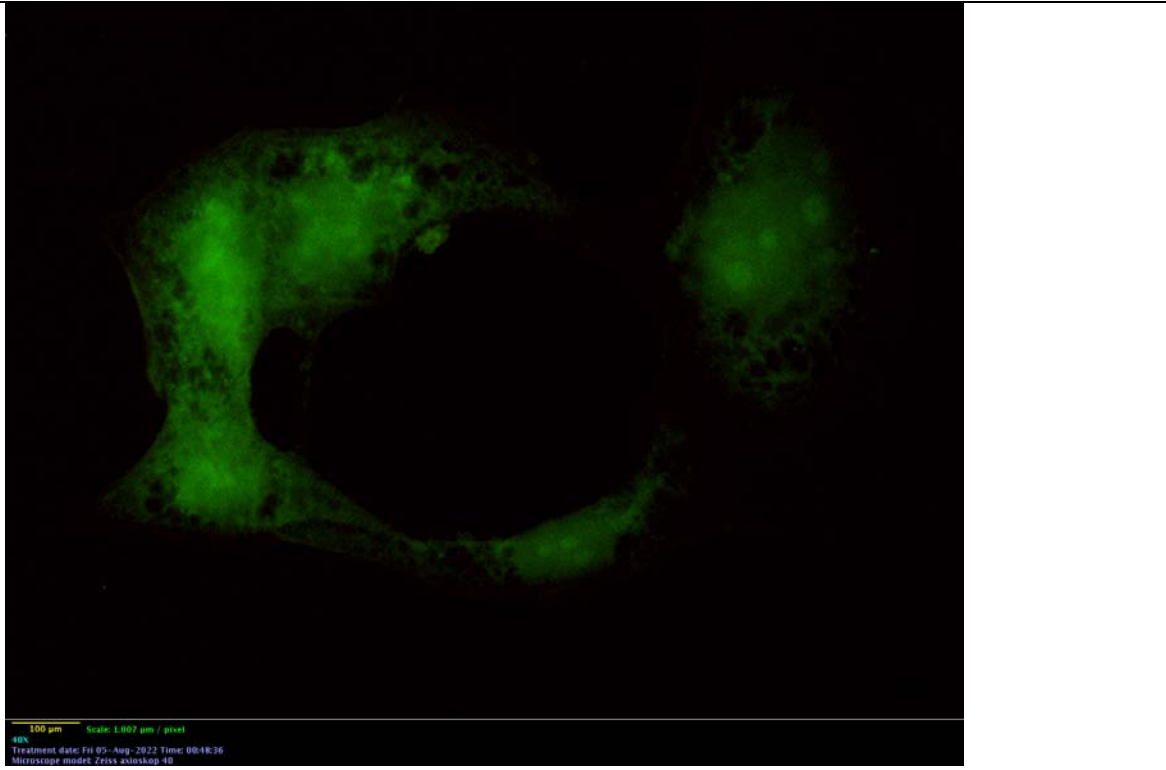


Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (A-1) Vimentina 40X

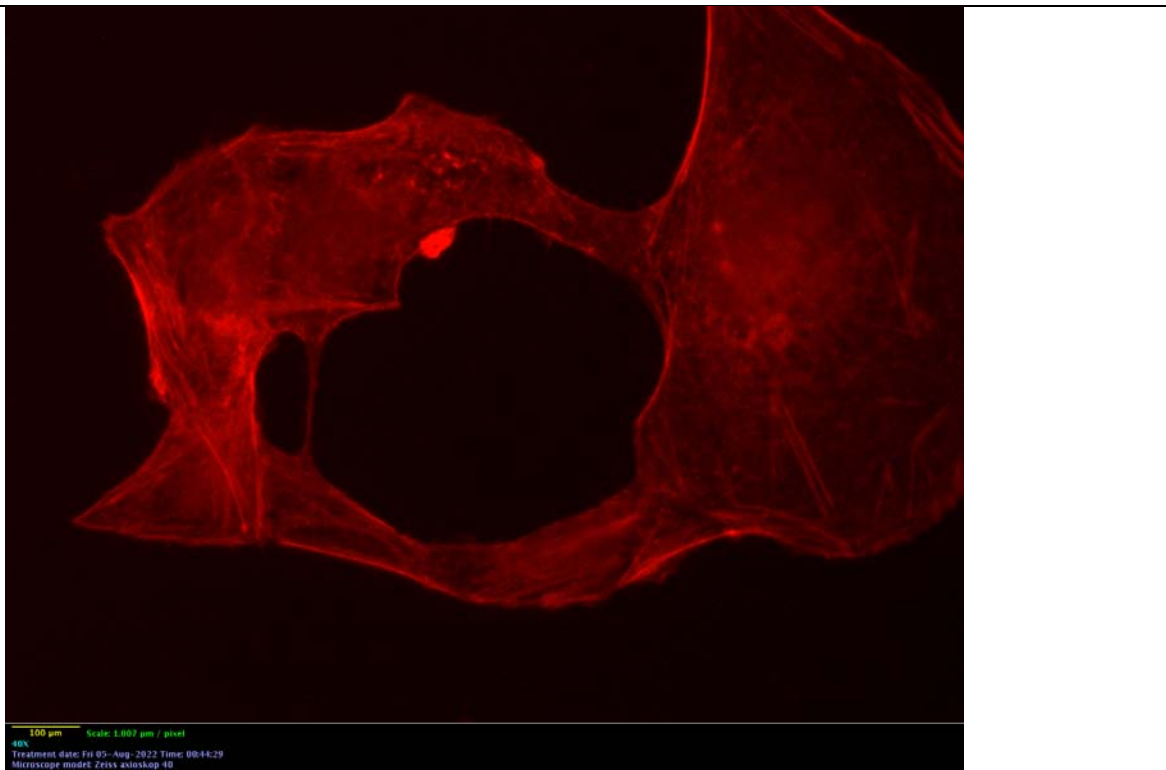


Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (B-1) Actina 40X

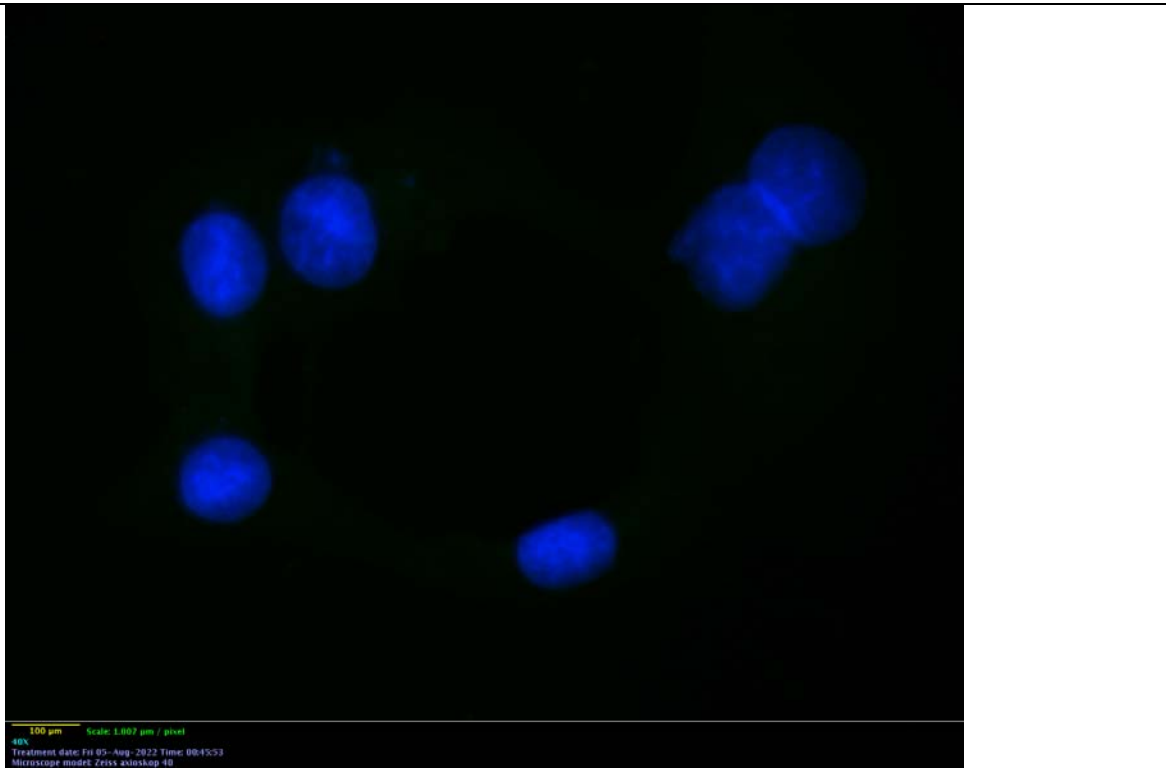


Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (C-1) DAPI 40X

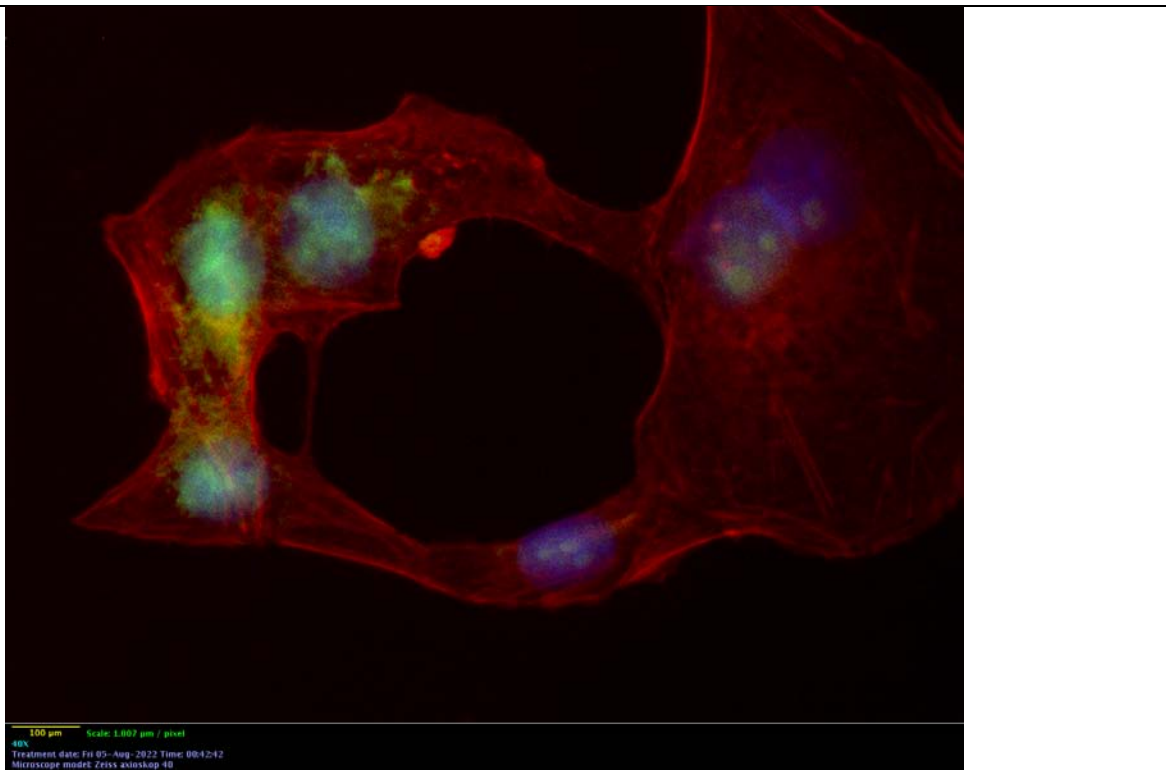


Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (D-1) Merge 40X

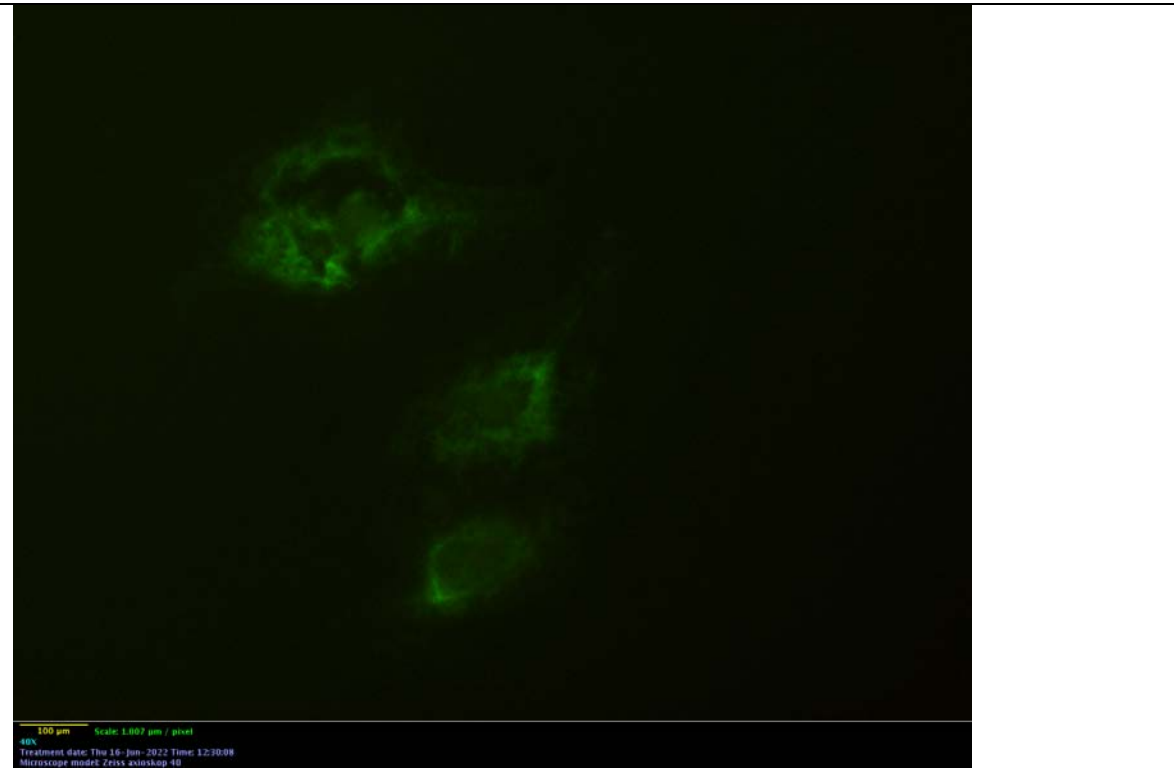


Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (A-2) Vimentina 40X

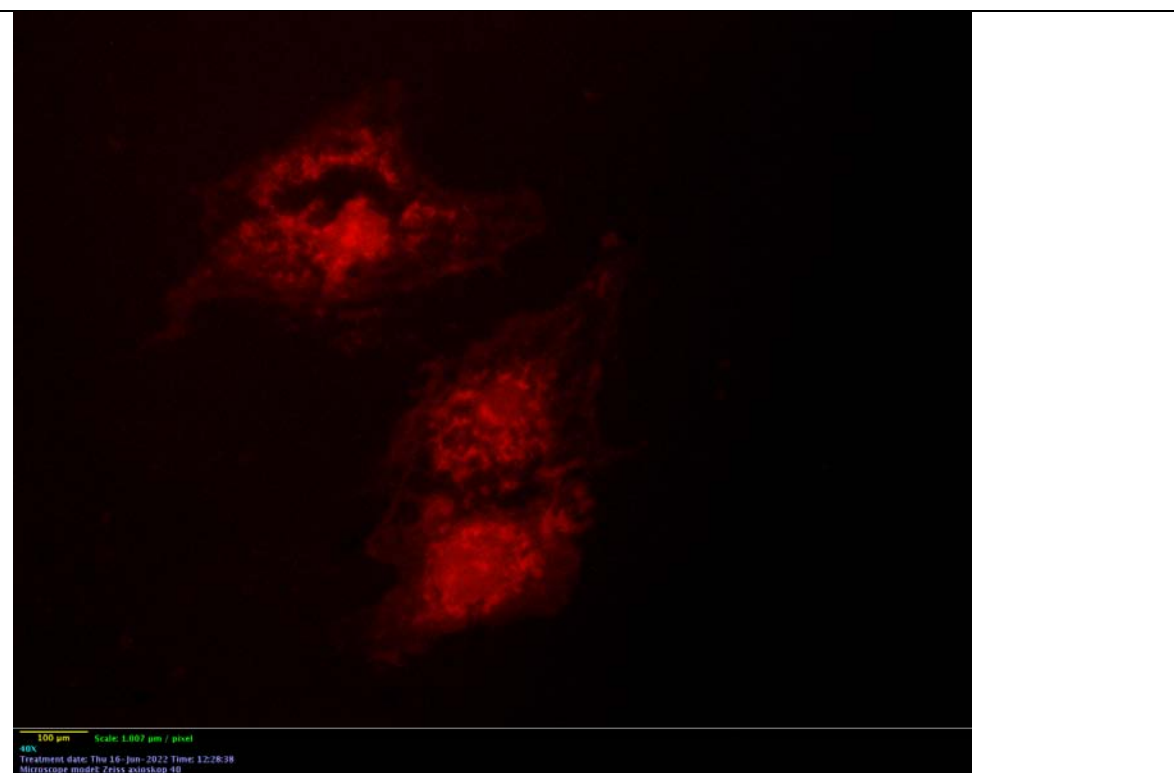


Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (B-2) Actina 40X

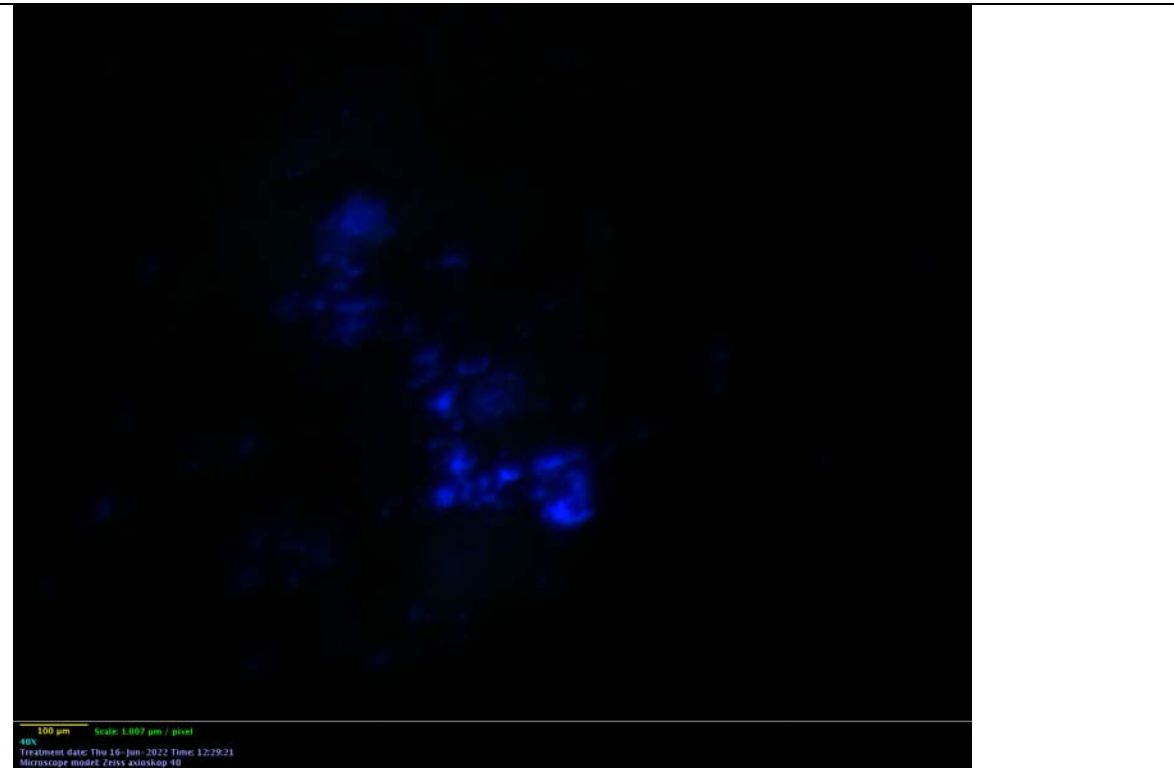


Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (C-2) DAPI 40X

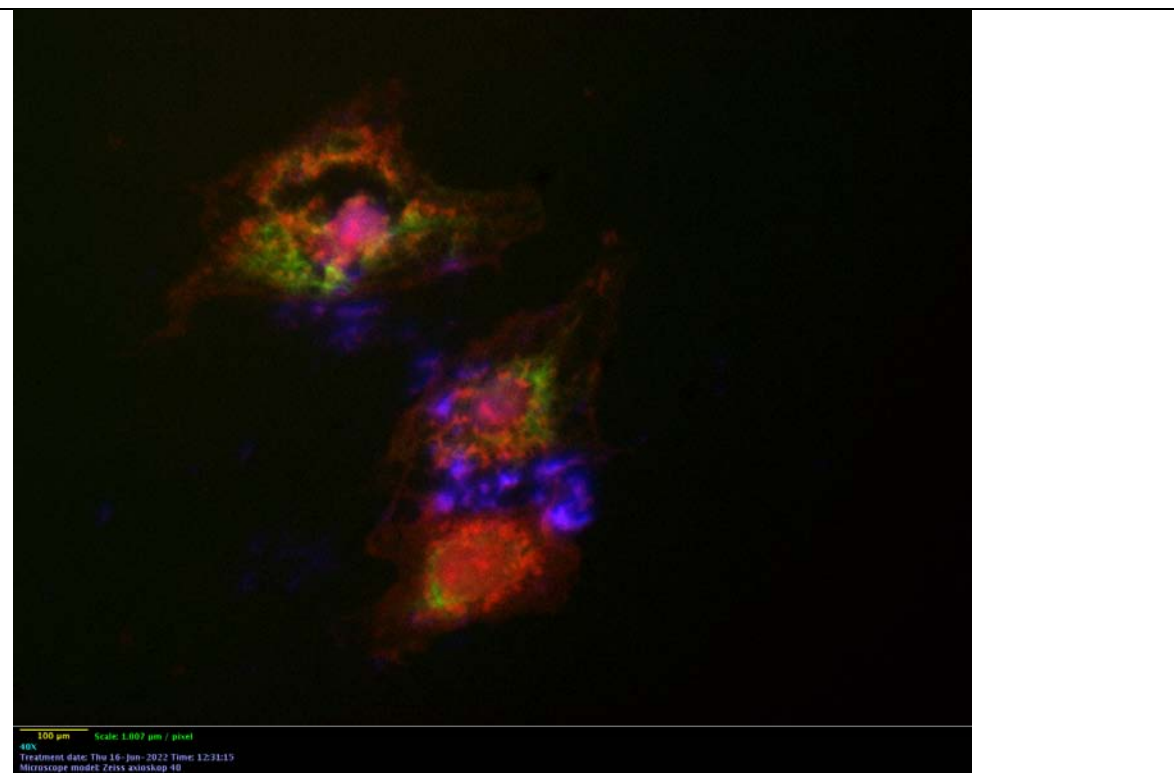


Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (D-2) Merge 40X



Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (A-3) Vimentina 40X

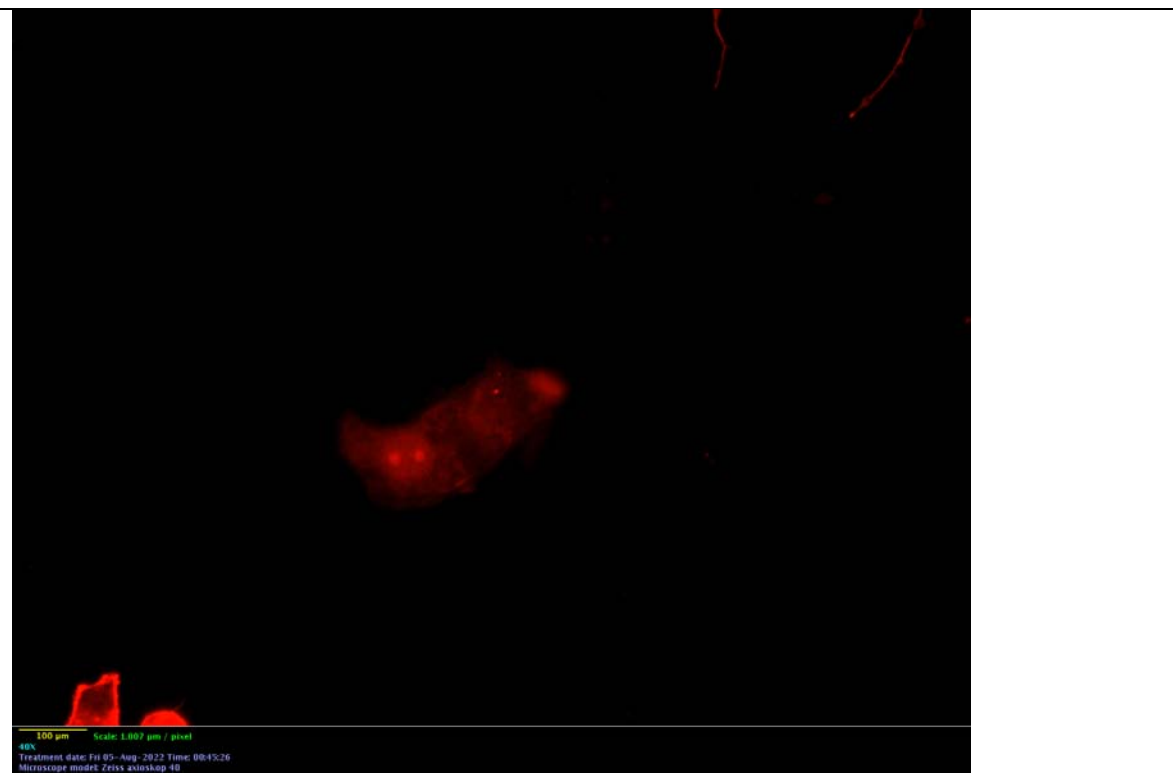


Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (B-3) Actina 40X



Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (C-3) DAPI 40X

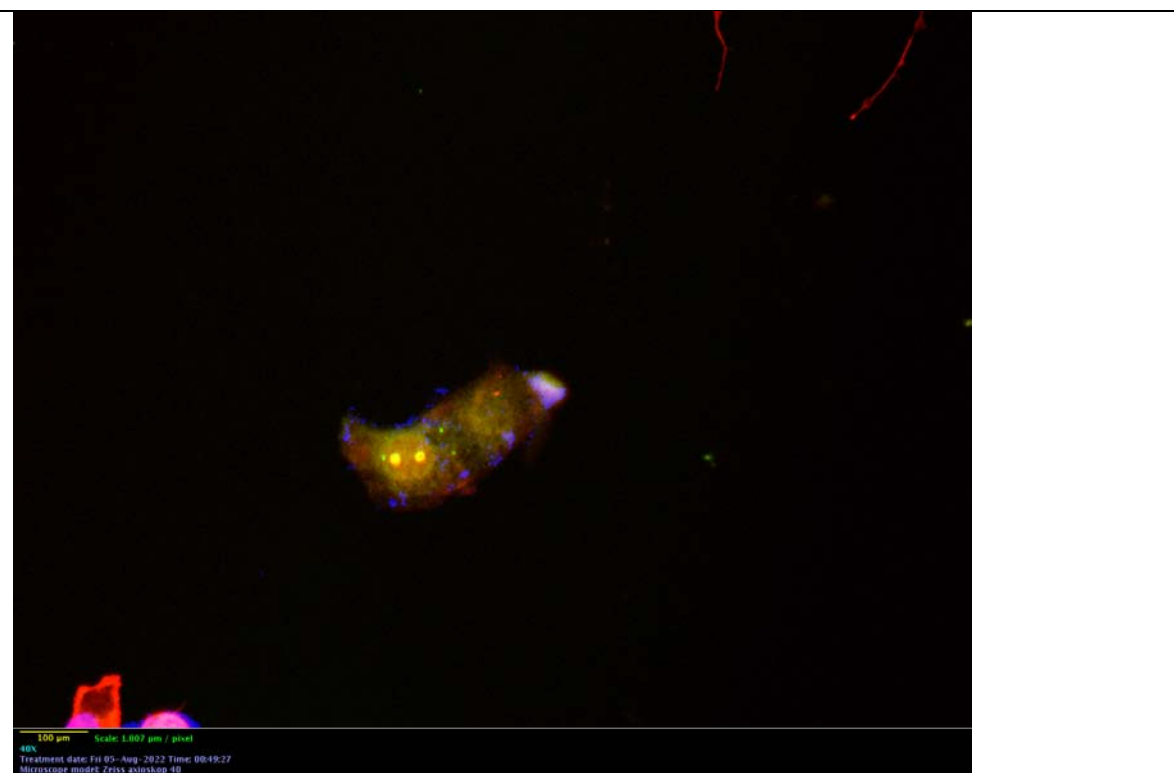


Fig. 15 Línea celular MARC-145 a las 48 hpi con el virus PRRS. (D-3) Merge 40X

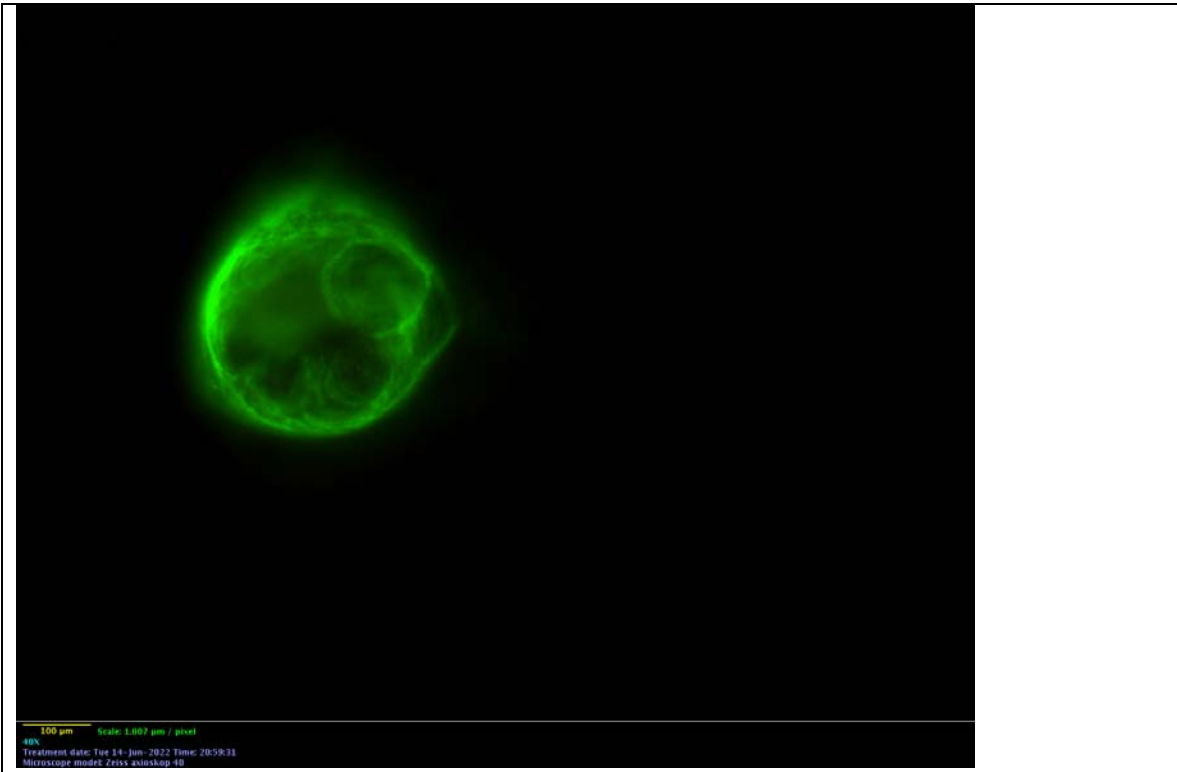


Fig. 16 Línea celular MARC-145 a las 72 hpi con el virus PRRS. (A) Vimentina 40X

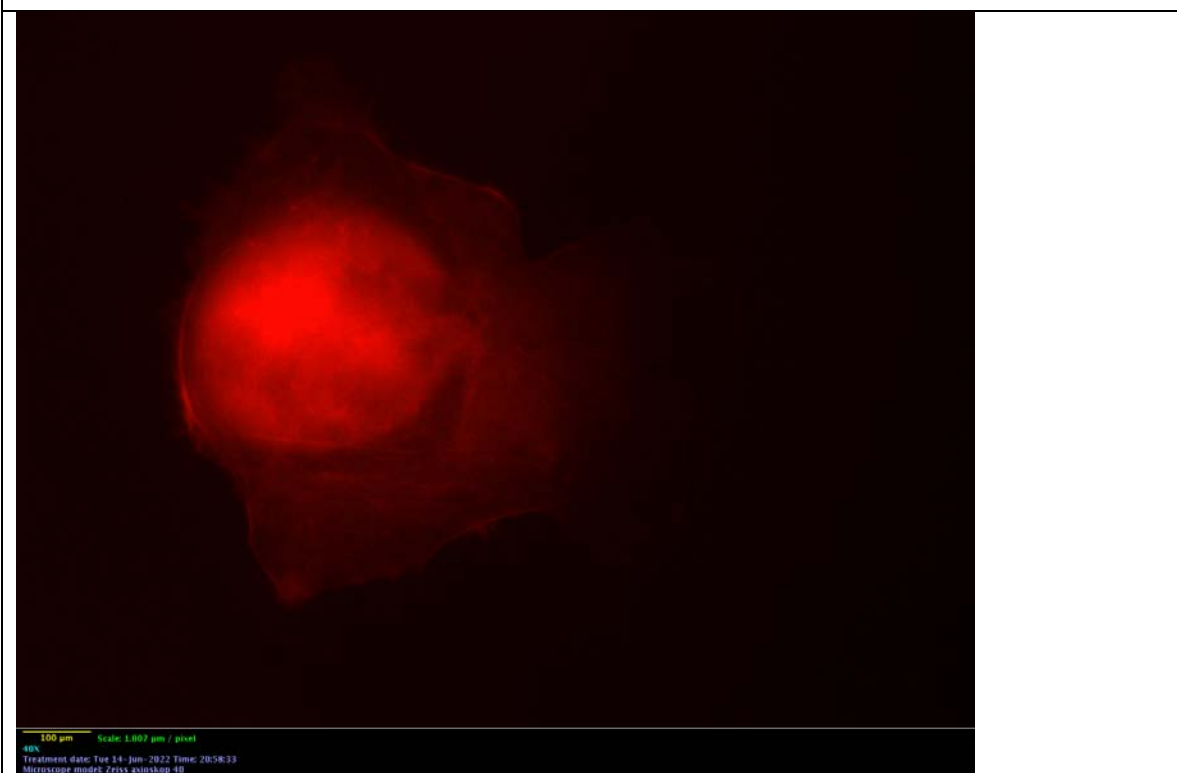


Fig. 16 Línea celular MARC-145 a las 72 hpi con el virus PRRS. (B) Actina 40X

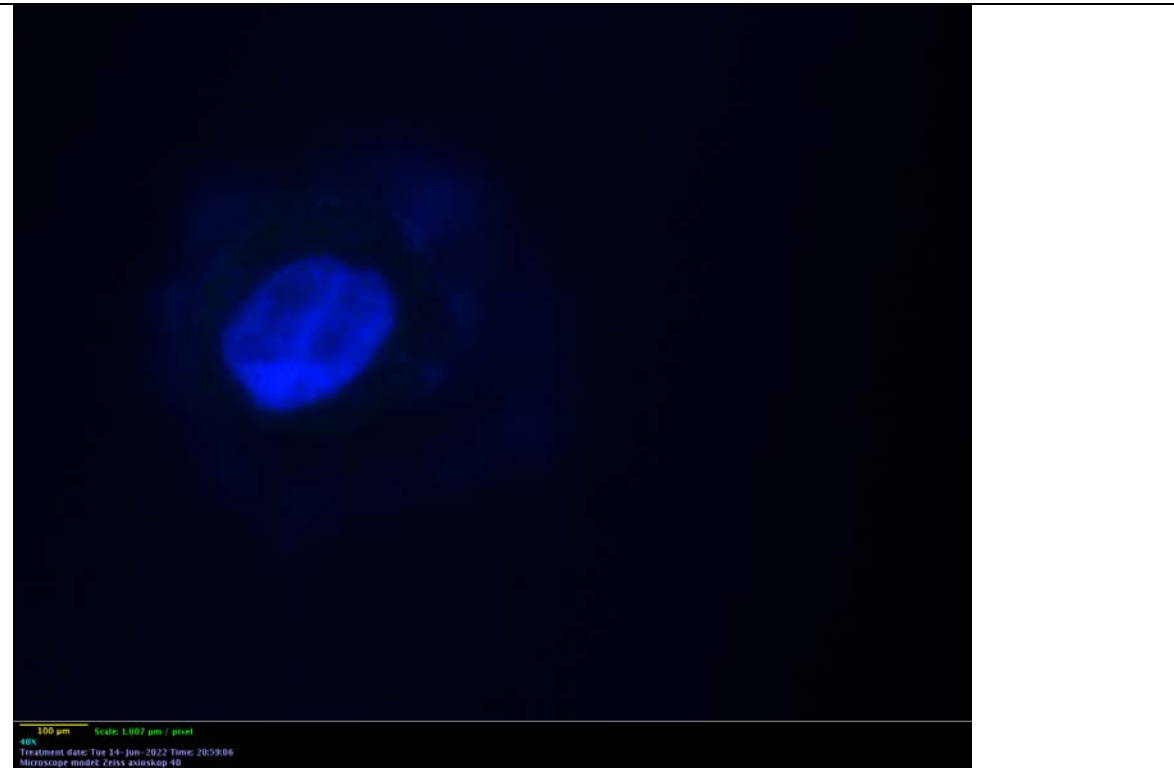


Fig. 16 Línea celular MARC-145 a las 72 hpi con el virus PRRS. (C) DAPI 40X

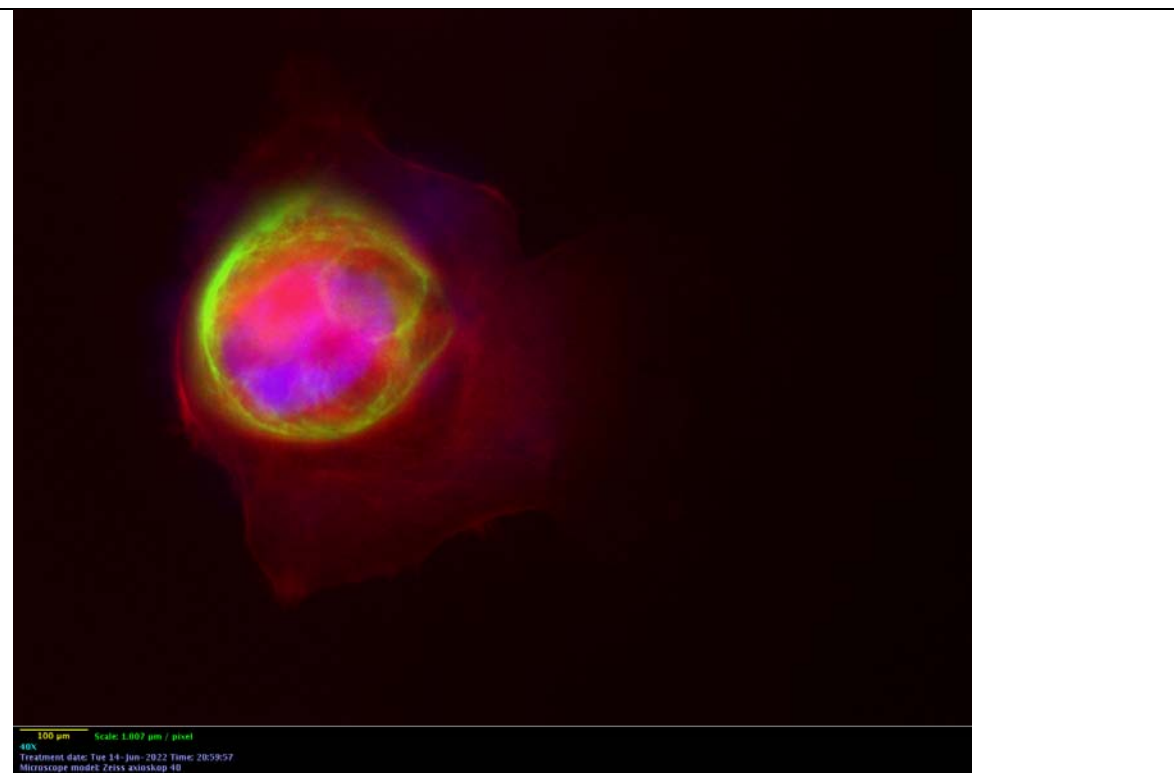


Fig. 16 Línea celular MARC-145 a las 72 hpi con el virus PRRS. (D) Merge 40X