



**MODELO DE INFECCIÓN DE CÉLULAS HEp-2 CON *Chlamydia trachomatis*
SEROVAR L2 (EB'S/LGV VR-902B) Y SU APLICACIÓN EN INVESTIGACIÓN.**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
PROYECTO DE GRADO
BOGOTÁ D.C.
NOVIEMBRE
2018**



**MODELO DE INFECCIÓN DE CÉLULAS HEP-2 CON *Chlamydia trachomatis*
SEROVAR L2 (EB'S/LGV VR-902B) Y SU APLICACIÓN EN INVESTIGACIÓN.**

**PAOLA ANDREA CARO BURGOS
YESSICA MARCELA CASTAÑEDA FRANCO
NATALIA CASTELLANOS HERNÁNDEZ**

**Dra. RUTH MELIDA SÁNCHEZ MORA. MSc. PhD.
ASESORA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA D.C.
2018**

DEDICATORIA

A mis papás, Alfredo y Patricia, por brindarme incondicionalmente su apoyo durante toda mi vida, en especial en esta etapa profesional donde su confianza, amor y comprensión me ayudaron a seguir siempre adelante dando lo mejor de mí y siempre creyendo en mis capacidades, los amo con todo mi corazón.

A mi hermana Danna Juliette, por ser una amiga excepcional, por colaborarme y aconsejarme siempre que lo necesite, enseñarme a ser mejor persona y estudiante aprendiendo nuevas cosas.

A mi familia, llena de principios y valores, a mi abuelita Atalía Sánchez por su infinito cariño, gracias por ser la mejor abuelita que un nieto puede tener.

A mis compañeras, con quien tuve la fortuna de compartir este proyecto y espero sigamos igual de comprometidas para alcanzar todas nuestras metas.

Marcela Castañeda Franco.

A mis padres, por todo su apoyo, comprensión y amor incondicional, por acompañarme en este camino y ser mi mayor motivación, por sus enseñanzas, consejos y valores, que me hicieron ser quien soy ahora.

*A mis hermanas por su compañía y todo lo brindado;
a ustedes, los amo infinitamente.*

A todas aquellas personas que hacen parte importante en mi vida, por los momentos compartidos y lo que vendrá, por estar en mi camino y por la amistad construida

Natalia Castellanos Hernández.

Agradezco a Dios en primer lugar, por brindarme la oportunidad de tener unos padres maravillosos Dolores Burgos y José Alirio Caro, con quienes adquirí valores que hoy definen mi vida y son el motor de todos mis sueños, siempre fueron un ejemplo de superación, sacrificio y voluntad, enseñándome a valorar todo lo que tengo, pero en especial a mi Madre por estar presente en este largo camino que ahora da frutos, por acompañarme esas largas noches y estar incondicionalmente para brindarme su apoyo.

A mi hermano Alejandro Caro Burgos que constantemente me apoyo, a todas estas personas han influido en mi vida para superar cada reto que se presente en mi vida.

A mis compañeras con las cuales conquistamos una meta, pero queda aún más camino para llegar a nuestros sueños.

Paola Andrea Caro Burgos

AGRADECIMIENTOS

Un enorme agradecimiento a la doctora Ruth Mélida Sánchez Mora, por todo el apoyo brindado para el desarrollo de este proyecto, gracias por su compromiso, dedicación y cariño.

A la profesora Martha Gómez por su colaboración y paciencia.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia por brindarnos las células para dar inicio a este proyecto.

Al grupo de Biotecnología y Genética UCMC quienes nos acogieron desde su semillero y nos guiaron desde el desarrollo hasta su finalización, así como el aporte de instalaciones, materiales, reactivos e insumos.

A nosotras, por destacarnos como un excelente grupo de trabajo, responsable, comprometido, perseverante, constante ante los obstáculos presentados en este largo camino que nunca nos dejó desfallecer.

Y a todas aquellas personas que nos otorgaron un granito de arena durante todo el desarrollo experimental del proyecto.

Marcela Castañeda, Natalia Castellanos y Andrea Caro.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1. OBJETIVOS.....	15
1.1. Objetivo general.....	15
1.2. Objetivos específicos.....	15
2. ANTECEDENTES.....	16
3. MARCO TEORICO	20
3.1 Líneas celulares como modelo de investigación celular.....	20
3.2 Cultivo celular.....	20
3.2.1 Ventajas del Cultivo Celular	21
3.2.2 Desventajas	22
3.3 Línea celular HEp-2.....	23
3.4 <i>Chlamydia trachomatis</i>	24
3.4.1 Ciclo de Vida.....	26
3.4.2 Interacción huésped – parásito.....	27
3.4.3 Transmisión.....	28
3.4.4 Factores de riesgo.....	29
3.4.5 Enfermedades relacionadas	29
3.4.6 Presentación clínica.....	30
3.4.7. Prevalencia en Colombia.....	31
3.4.8 Diagnóstico y tratamiento convencional para <i>Chlamydia trachomatis</i>	32
3.5. <i>Chlamydia trachomatis</i> serovar L2.....	33
3.6 ATCC (EB's/ LGV - L2 VR 902B)	34
3.7 Aplicaciones del modelo de investigación con <i>Chlamydia trachomatis</i>	34
4. DISEÑO METODOLÓGICO.....	39
4.1. Tipo y enfoque de la investigación.....	39
4.2. Universo, población y muestra	39
4.3. Hipótesis	39
4.4 Procedimientos y técnicas.....	39
4.4.1 Establecimiento del cultivo de la línea celular HEp-2.....	40
4.4.2 Infección de células HEp-2 con <i>Chlamydia trachomatis</i>	45
4.4.3 Protocolo de la infección.....	46
4.5 Evaluación estadística de los datos obtenidos.....	52
5. RESULTADOS.....	53
5.1 Cultivo de la línea celular HEp-2.....	53
5.2 Coloración de Giemsa.....	58

5.3 Infección de células HEp-2 con <i>Chlamydia trachomatis</i>	61
5.3.1 Determinación de la concentración celular	61
5.3.2 Infección de las células Hep2.....	65
5.3.3 Inmunofluorescencia directa.....	73
6. DISCUSIÓN.....	77
7. CONCLUSIONES	84
8. REFERENCIAS	85

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. (A) Cuerpo elemental de <i>C. trachomatis</i> . (B) Cuerpos reticulados de <i>C. trachomatis</i> . (Fuente: Revista NOVA. 2003).	25
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Chlamydia trachomatis</i> , bacteria intracelular. (Fuente: Desenmascarando a las ITS. 2014).	27
Figura 3. Prevalencia de infecciones por <i>C. trachomatis</i> en Colombia durante el periodo 2009-2015.	32
Figura 4. Modelos para la inducción de muerte celular durante la infección con mutantes <i>cpoS</i> la pérdida de estos en la inclusión provoca una muerte aumentada en las células infectadas tomado de (Fuente: Cell Host & Microbe 2017).	36
Figura 5. La infección por <i>C. trachomatis</i> no altera la localización nuclear de pSTAT1 en células pretratadas con IFN γ . (Fuente: Scientific Reports. 2018).	36
Figura 6. Diagrama de los cultivos en las etapas de diferenciación, estratificación e infección (Fuente: Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2017).	37
Figura 7. (A) Cámara de Neubauer. (B) Cuadrantes contados para conocer la viabilidad celular (Tomada por las autoras).....	41
Figura 8. Laminillas de 13 mm de diámetro dispuestas en las placas de 6 pozos (Tomado por las autoras).	43
Figura 9. Coloración de Giemsa en placa de 6 pozos a células HEp-2. (A) . Adición de 1 mL de solución de trabajo a cada uno de los pozos de la placa de cultivo. (B) . Lavado de cada uno de los pozos para retirar exceso de colorante. (C) . Laminillas coloreadas sobre los pozos luego de realizar los lavados. (D) . Laminillas circulares con células HEp-2 teñidas sobre láminas portaobjetos listas para ser observadas al microscopio óptico (Tomado por las autoras).	44
Figura 10. Coloración de Giemsa en MilliCell EZ Slide (Tomada por las autoras). .	46
Figura 11. (A) . Microscopio invertido, laboratorio de biotecnología y genética – Universidad Colegio mayor de Cundinamarca. (B) . Soluciones protocolo de infección SPG (Sucrose-Phosphate-Glutamate Buffer) y HBSS (solución salina equilibrada de Hanks) (Tomado por las autoras).....	47
Figura 12. Lamina MilliCell EZ Slide empleada para determinar la concentración de EB's para obtener la mejor infección celular. Pozo 1 y 8: Controles negativos (A)	

Concentraciones de EB's visualizadas tras 24 h.p.i. (B) Concentraciones de EB's visualizadas tras 48 h.p.i.	49
Figura 13. Lamina MilliCell EZ Slide empleada para determinar la concentración de EB's, relación SPG y EB's para cada pozo en volumen (uL). Concentraciones de EB's visualizadas tras 24 h.p.i y 48 h.p.i.	49
Figura 14. Conteo de viabilidad celular en cámara de Neubauer por el método de Azul de Tripán. (A). Se observan células vivas. (B). Las flechas señalan las células muertas encontradas en la preparación (Tomadas por las autoras).	54
Figura 15. Viraje del medio DMEM en las cajas de cultivo a causa del metabolismo de las células HEP-2 sembradas (Tomadas por las autoras).	56
Figura 16. Viraje del medio DMEM vs confluencia de las células HEP-2 observadas al microscopio invertido en objetivo de 10X a diferente hora desde su siembra. (A). Células a las 0 horas, en suspensión. (B). Células a las 24 horas, confluencia del 30%. (C). Células a las 48 horas, confluencia del 60%. (D). Células a las 72 horas, confluencia del 90% (Tomadas por las autoras).	56
Figura 17. Células HEP-2 con el 90% de confluencia en diferentes aumentos observada al microscopio invertido (A). Se observa la confluencia entre las células, monocapa de células en la placa en un aumento de 10X. (B). Se observa un campo en el cual las células están con gran confluencia en objetivo de 40X (C). Se observan células HEP-2 confluentes en objetivo de 40X (Tomadas por las autoras).	57
Figura 18. Stock de células HEP-2, crioviales mantenidos a -70°C en el REVCO.	58
Figura 19. Coloración de Giemsa a células HEP-2 en diferentes tiempos de tinción. (A). 15 minutos, (B). 30 minutos, (C). 40 minutos, (D). 60 minutos, coloreadas con solución de trabajo a una concentración de 30 partes de Solución amortiguadora y 1 parte de solución madre.	59
Figura 20. Células HEP-2 teñida con Giemsa en objetivo de 40x presentando la descripción de las partes celulares observadas tras la coloración. (Tomada por las autoras).	60
Figura 21. Coloración de Giemsa aplicada a células HEP-2 en diferentes aumentos al microscopio óptico estandarizada a 60 minutos de exposición al colorante. (A). Células HEP-2 en aumento de 10x. (B). Células HEP-2 en aumento de 20x. (C) y (D). Células HEP-2 en aumento de 40x, distintos campos.	60
Figura 22. Lamina MilliCell EZ Slide empleada para determinar la concentración celular. (A). División y referenciación de los pozos de la laminilla MilliCell EZ Slide. (B). Concentraciones de medio y células para cada pozo en volumen (uL); Pozo 1 y 8: Controles negativos.	62
Figura 23. Visualización de las concentraciones celulares a través del microscopio invertido.	63
Figura 24. Lamina MilliCell EZ Slide empleada para determinar la concentración celular entre 50,000 y 60,000 células. Pozo 1 y 8: Controles negativos.	64
Figura 25. Concentración de células HEP-2 visualizada al microscopio invertido. (A). Concentración de 50.000 células con una confluencia del 90%. (B). Concentración de 60.000 células con una confluencia del 80%.	65

Figura 26. Cuerpos elementales de <i>C. trachomatis</i> vistos en cámara de Neubauer al microscopio invertido en objetivo de 10X. Las flechas señalan los EB's vistos en cada campo.....	66
Figura 27. Células HEp-2 teñidas con coloración de Giemsa visualizadas al microscopio óptico en objetivo de 100x, (A) Control negativo: Células HEp-2 sin infectar. (B) Diferencia entre una célula (demarcada en color morado) adherida formando monocapa con citoplasma, núcleo y nucléolos característicos y cuerpo elemental (demarcado en color azul) con su forma ovoide.	67
Figura 28. Células HEp-2 infectadas con diversas concentraciones de cuerpos elementales de <i>C. trachomatis</i> , observadas al microscopio óptico en objetivo 10X cumplidas las 48 hrs post-infección. (A). Control Negativo. (B). 10 uL de EB's. (C). 20 uL de EB's. (D). 40 uL de EB's.....	68
Figura 29. (A) Pozo de células HEp-2 (control negativo) observado en objetivo de 10X a las 24 horas de cultivo antes de iniciar la infección, a una concentración celular de 50.000/cél alcanzando 90% de confluencia. (B) Células HEp-2 (control negativo) observado en objetivo de 40X.	69
Figura 30. Células HEp-2 teñidas con Giemsa infectadas con cuerpos elementales de <i>C. trachomatis</i> a las 24 h.p.i., coloreadas con Giemsa. (A). Se visualiza una forma de inclusión intracelular señalizada con una circunferencia roja en la parte central, y un cuerpo elemental en el parte inferior igualmente señalizado, en objetivo de 100X (B). Cuerpos de <i>C. trachomatis</i> observados intracelularmente (Zona izquierda) y próximos al citoplasma de las células (Zona derecha), en objetivo de 40X.....	71
Figura 31. Células HEp-2 a las 48 h.p.i. teñidas con Giemsa y visualizadas en diferentes objetivos al microscopio óptico. (A) Células vistas en objetivo de 10x, que presentan cuerpos elementales demarcados por la señalización roja próximos a citoplasmas celulares. (B) Cuerpos elementales observados en 40x. (C) HEp-2 observadas en objetivo de 100x vacuoladas. (D). Células apoptóticas.....	71
Figura 32. Células HEp-2 teñidas con Giemsa infectadas con cuerpos elementales de <i>C. trachomatis</i> y vistas al microscopio óptico. (A). En objetivo de 40X, se observa una célula siendo infectada con un cuerpo elemental ingresando a la misma a las 48 h.p.i. (B). Campo observado anteriormente en objetivo de 100X. (C). Cuerpo de inclusión próximo a citoplasma celular visto en objetivo de 40X. (D). Cuerpos elementales cercanos a las células infectadas con <i>C. trachomatis</i>	72
Figura 33. Control Negativo, células HEp-2 no infectadas con EB's de <i>C. trachomatis</i> no demuestran fluorescencia. (A). Objetivo de 10x, células confluentes sin fluorescencia emitida. (B). Se observan núcleos teñidos de azul con Hoechst y la ausencia de fluorescencia por parte del Anticuerpo ab21211 en las células.	74
Figura 34. Células HEp-2 infectadas con EB's de <i>C. trachomatis</i> observadas al microscopio de fluorescencia en objetivo de 10x, donde las flechas señalan claramente la presencia de <i>C. trachomatis</i> (fluorescencia verde) dentro de los citoplasmas celulares, demostrando su infección.	74
Figura 35. Células HEp-2 infectadas con EB's de <i>C. trachomatis</i> , en las cuales se visualizan núcleos celulares teñidos con Hoechst y estructuras verde fluorescente	

pertenecientes a *C. trachomatis* marcada con anticuerpo ab21211. Fluorescencia emitida a las 72 horas post-infección **(A)** en objetivo de 20X y **(B)** objetivo de 10X, con 40uL de cuerpos elementales. 75

Figura 36. (A). Células HEp-2 infectadas con EB's de *C. trachomatis*, visualizada sin filtros, con luz blanca. **(B).** Merge entre la imagen A y la imagen de C- Ac ab 21211 donde se verifica que las formas observadas en la imagen A diferentes a las células son cuerpos de *C. trachomatis*. **(C).** Hoeschst: Células HEp-2 visualizadas con el filtro I3 donde se observan núcleos celulares teñidos con Hoechst Ac ab 21211: Estructuras verdes fluorescentes pertenecientes a *C. trachomatis* marcada con anticuerpo ab21211. Merge: Solapamiento entre las dos imágenes anteriormente descritas donde se corrobora la infección celular con cuerpos elementales. 76

Figura 37. Aplicaciones de *C. trachomatis* en áreas del conocimiento como genética, inmunología y terapia. 83

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Propiedades generales del genoma de *Chlamydia trachomatis* de diferentes serovares. 34

Tabla 2. *Características específicas de la cepa ATCC VR -902B.* 34

Tabla 3. Componentes de la coloración de Giemsa. (Tomado de Juntinico et al y modificado por las autoras). Solución de trabajo (tubo falcón 50 mL), compuesta por solución amortiguadora (Solución A y Solución B) y solución madre; metanol al 100% utilizado para fijar las células (Tomado por las autoras). 43

Tabla 4. Preparación de SPG (Sucrose-Phosphate-Glutamate)..... 48

Tabla 5. Preparación de HBSS (Solución salina equilibrada de Hanks) 48

Tabla 6. Concentración en uL de células en suspensión a adicionar por pozo. 62

Tabla 7. Rango de EB's en 25 células a 24 hrs y 48 hrs post infección en las 3 concentraciones. 67

Tabla 8. Rango aproximado de EB's en 50,000 células por pozo..... 68

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Viabilidad celular por el método de Azul de Tripán, Antes de ser congeladas y después de ser congeladas (Eje Y), Células vivas VS Células muertas (Eje X).....54

Gráfica 2. Crecimiento celular. Porcentaje de confluencia (Eje Y) VS Concentración celular (Eje X)..... 63

Modelo de infección de células HEp-2 con *Chlamydia trachomatis* serovar L2 (EB's/LGV VR-902B) y su aplicación en investigación.

Resumen: *Chlamydia trachomatis* es una bacteria Gram negativa, intracelular obligada caracterizada por causar infección únicamente en humanos (tanto hombres como mujeres) y estar relacionada con enfermedades de transmisión sexual e infecciones oculares, por lo que puede conllevar a secuelas de interés si no se da un tratamiento oportuno. Por lo anterior, *Chlamydia trachomatis* es un microorganismo importante de estudio; a través del siguiente proyecto se estableció el modelo de infección de células HEp-2 con cuerpos elementales (EB's) de *C. trachomatis* serovar L2 por medio de cultivo celular, donde se instauró las condiciones para el crecimiento adecuado de las células en un tiempo y con una confluencia determinada, para ser empleadas en los diferentes ensayos, efectuándose un protocolo de infección y siendo demostrado a partir de la coloración de Giemsa permitiendo evaluar características morfológicas tanto de las células HEp-2 sin infectar e infectadas y así mismo de los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* y finalmente aplicando la técnica de Inmunofluorescencia Directa para la detección de la proteína de membrana MOMP de *Chlamydia trachomatis*.

Tras los ensayos llevados a cabo se determinó la densidad celular necesaria para obtener una confluencia del 90% y poder realizar la infección, la cual se evidenció con presencia de cuerpos elementales próximos y dentro del citoplasma celular, vacuolas y además un notorio daño celular luego de la infección.

Este proyecto servirá como modelo de investigación para ser aplicado en diferentes campos científicos.

INTRODUCCIÓN

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) es una bacteria Gram negativa, intracelular obligada caracterizada por causar infección en humanos, generalmente asintomática, en población de diferentes edades que es sexualmente activa; encontrándose fuertemente relacionada con enfermedades de transmisión sexual e incluso infecciones oculares como el tracoma. *C. trachomatis* es de gran importancia para la salud pública debido a las secuelas que se producen comúnmente en mujeres por falta de tratamiento, entre ellas: infertilidad, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica (EPI), dolor pélvico crónico y la posibilidad de padecer un embarazo ectópico. A nivel individual, la infección por *C. trachomatis* generalmente puede tratarse con antibióticos, aunque la resistencia al tratamiento a estado aumentado. A nivel poblacional, el control de las infecciones por esta bacteria es bastante estudiado. (1)

Por lo anterior, se ha considerado establecer la infección de células HEp-2 con *Chlamydia trachomatis* serovar L2 (VR- 902B) como modelo de investigación básica para ejecutar diferentes estudios sobre este microorganismo y así mismo, poder evaluar diversidad de factores morfológicos, genéticos, inmunológicos y de tratamiento, como los péptidos antimicrobianos (AMPs) que son una buena alternativa terapéutica, presentando propiedades antimicrobianas rápidas y de amplio espectro, como potencial de antibióticos farmacéuticos, conociendo que no está exento de generar resistencia a los antibióticos con los que usualmente es tratada la infección que causa.

Dado a la importancia del tema en cuestión, el objetivo del siguiente proyecto fue establecer el modelo de infección de *C. trachomatis* serovar L2 sobre células

eucariotas HEp-2, con el uso de técnicas como cultivo celular, coloración de Giemsa e Inmunofluorescencia, para permitir la propagación del microorganismo proporcionándole las condiciones necesarias para este fin y corroborar su presencia e infectividad.

A través del siguiente proyecto se espera poder aportar a la comunidad y a la ciencia, para generar nuevo conocimiento y avances frente a los retos que en materia de *Chlamydia trachomatis* surjan en el presente y en el futuro.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general.

Establecer un modelo de infección de células HEp-2 con *Chlamydia trachomatis* serovar L2 (EB's/LGV VR-902B) para su aplicación en investigación.

1.2. Objetivos específicos.

1. Instaurar un cultivo celular de HEp-2 para realizar la infección.
2. Efectuar la infección de células HEp-2 con el serovar L2 de *Chlamydia trachomatis*.
3. Describir las posibles aplicaciones del modelo de investigación de células HEp-2 con *Chlamydia trachomatis* serovar L2.

2. ANTECEDENTES

En la última década se han desarrollado variedad de estudios que giran en torno al uso de modelos de investigación, como es en este caso el cultivo celular, empleado para evaluar *C. trachomatis* serovar L2 y su comportamiento frente a diferentes áreas del conocimiento.

La línea celular HEP-2 se estableció como un modelo celular ya que en particular su ritmo de multiplicación es superior a lo normal debido a su procedencia y su amplio uso en investigación. En uno de los primeros estudios, realizados por *Shemer Y. et al (2)*, emplearon células HEP-2 y partículas infecciosas de *Chlamydia* (L2 / 434 / Bu) con interferón gamma humano altamente purificado para evaluar el rendimiento de las partículas infecciosas por medio de ensayos con microscopía electrónica. Mostraron que el interferón no afectó la conversión de *C. trachomatis* a cuerpos reticulados, pero influyó en el grado de maduración de los cuerpos elementales. Las altas concentraciones de interferón inhibieron la formación del cuerpo de inclusión y dieron como resultado la aparición de cuerpos reticulados aberrantes.

Respecto a la proteína HSP y su expresión bajo situaciones de estrés celular en células HEP-2 infectadas por *C. trachomatis*, se destaca el trabajo de *Hervé C et al (3)* en el cual se evalúa la expresión de los genes (*Ct110*, *Ct604*, *Ct755*) que codifican para la proteína HSP60 de *C. trachomatis* en diferentes tiempos post-infección para valorar la expresión del ARNm y el patrón de persistencia en la infección, mediante técnicas moleculares como RT-PCR en tiempo real, por tanto, dichos tiempos dan a conocer que cada gen Chlamydial que codifica la HSP60 se

expresa de forma independiente de la infección activa frente a la infección persistente. Además, se sugiere que el producto del gen *Ct604*, como futuro estudio, puede funcionar de manera importante durante la persistencia de *C. trachomatis*, por ello el desarrollo de prototipos y/o modelos de infección en células HEP-2 frente a *Chlamydia trachomatis* abre las puertas a la implementación de nuevas técnicas moleculares y genéticas en investigación.

Destacan trabajos como el de Huston WM et al (4) en el que se logra inducir la apoptosis en células HEP-2 infectadas con *Chlamydia trachomatis* serovar L2 inhibiendo las rutas de la respuesta inmune innata por medio de un compuesto formado por la combinación de activadores del sistema inmune innato como lipopolisacárido y el Poly I:C (*Polyinosinic:polycytidylic acid*) con Wedelolactona (inhibidor inmune innato) adicionados en dos diferentes momentos a las 0 y 36 horas post-infección (h.p.i), lo cual generó un impacto sobre la viabilidad del microorganismo. Lo anterior se comprobó utilizando microscopía confocal y fluorescencia.

En relación con el uso del serovar L2 de *Chlamydia trachomatis* utilizado en modelos de infección, como el señalado en el trabajo de Takeru Kubo et al (5), evalúan las propiedades de crecimiento de *C. trachomatis* L2 en células Jurkat linfoides en comparación con las observadas en las células epiteliales HeLa, en la cual ambas células respaldaron el crecimiento de *C. trachomatis* con un aumento similar en las progénesis infecciosas. Las bacterias que infectan las células Jurkat fueron más susceptibles a los antibióticos (doxiciclina, azitromicina, ofloxacina) que las células HeLa. Por lo tanto, llegaron a la conclusión de que *C. trachomatis* serovar L2 podría infectar células Jurkat con propiedades linfoides, proporcionando una nueva herramienta para estudiar la diseminación de *C. trachomatis* a los tejidos

a través del movimiento de linfocitos y la aplicación de cultivo celular como modelo de investigación.

También es de importancia el trabajo de Baishakhi Datta et al (6) en el que se infectó los serovares Ba, D, L2 con cada una de la variante de *C. trachomatis* en células HeLa para demostrar que los monocitos diseminan este patógeno por todo el cuerpo, mientras que las células dendríticas (CD) juegan un papel importante en la mediación de la respuesta inmune contra la infección bacteriana por medio de cultivo celular, microscopía de fluorescencia, RT-PCR, cuantificación y demás.

Por otro lado, Paul JS Skipp et al (7), realizó un estudio sobre el serovar L2, dado a su alta relación de infectividad entre partículas y la secuencia del genoma, donde evidenciaron que los cuerpos elementales (EB's) son metabólicamente activos; esta conclusión fue demostrada a través de proteómica cuantitativa usando además procedimientos como PCR, centrifugación por gradiente y espectrometría de masas.

El serovar L2 de *C. trachomatis* ha sido usado en varios modelos celulares como el de Weber MM et al (8), en el que se demuestra que se requieren tres proteínas de membrana de inclusión específicas para la estabilidad de la misma y permitir el desarrollo de *C. trachomatis*, siendo cruciales para evitar la muerte celular por activación de apoptosis tras el reconocimiento del microorganismo por autofagolisosomas, al mantener la integridad de las vacuolas; señalando como tal, su importancia en el establecimiento de un compartimiento replicativo que evade al sistema de vigilancia del huésped, a partir del análisis de *Chlamydia trachomatis* serovar L2, por procedimientos como cultivo celular con células HeLa, inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-MOMP, inmunoblotting y construcción de plásmidos, entre otros.

El genoma con el que cuenta *Chlamydia* es muy variado cuyo cromosoma es circular y codifica genes necesarios para la replicación, transcripción, traducción del ADN, y casi 900 genes codificadores de proteínas, incluidos genes para la biosíntesis del peptidoglicano. *C. trachomatis*, codifica ocho glicoproteínas de plásmido que no son críticas para el crecimiento de *Chlamydias* in vitro, pero juegan un papel fundamental en la patogénesis de la misma; por otro lado, el creciente aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos, ha sido un fenómeno extremadamente raro como la resistencia a la azitromicina que a menudo es el resultado de las mutaciones en la región peptidil transferasa de los genes 23S rRNA, la resistencia a tetraciclina generalmente está ligada a la presencia de islas genómicas foráneas integradas en el cromosoma *Chlamydial*, fluoroquinolonas como resultado de una mutación puntual en el *gyrA* una región determinante de la resistencia a la quinolona y como estos muchos más descritos, por lo tanto los sistemas basados en cultivo celular son indispensables para evaluar la sensibilidad a diferentes antibióticos utilizados como guía clínica para el tratamiento de este microorganismo que en el mundo ocupa una de las infecciones bacterianas más importantes como en el presente estudio realizado por la Dr. Zora Profozic et al (9).

Los estudios mencionados anteriormente son base esencial para el desarrollo del presente proyecto ya que ofrecen una mirada hacia la importancia de investigar sobre *C. trachomatis* y establecer por ende el modelo de infección para posteriores estudios.

3. MARCO TEORICO

3.1 Líneas celulares como modelo de investigación celular.

Los modelos celulares se establecen como una herramienta del conocimiento en relación con el nivel celular del desarrollo del organismo humano, ya que orienta la comprensión de tres características básicas: patrón particular en cuanto a la síntesis de proteínas, cambios morfológicos adaptativos e información genética contenida en las células para así poder postular un modelo efectivo encaminado al desarrollo y producción de conocimiento en investigación.

Un cultivo celular tiene alta capacidad de multiplicarse *in vitro*, se establece a partir del primer subcultivo de un cultivo primario y que tiene las mismas características que el tejido de origen. La técnica del cultivo celular es la que ha permitido conocer el comportamiento *in vitro* de las células cancerosas y patologías en general, constituyendo una herramienta básica de aplicación fundamental en el campo médico o veterinario, en investigación y en la industria farmacéutica, ya que en las diferentes áreas se pretende analizar, describir, explicar, simular y entender un proceso fisiopatológico (10).

3.2 Cultivo celular

En cuanto al cultivo celular, este se origina de un cultivo primario o de primera explantación por dispersión mecánica o enzimática, estos cultivos consisten en numerosos linajes de células presentes originalmente en el cultivo primario, y es el primer paso de una serie de eventos y procesos selectivos que culminaran con la

formación de una línea celular bastante uniforme; las líneas celulares pueden ser finitas o infinitas dependiendo del origen y las características del cultivo.

Lograda la dispersión del cultivo celular primario, la suspensión de células se siembra en un recipiente y se espera que las células se adhieran, se desplacen y se multipliquen hasta cubrir todo el espacio disponible del recipiente, cuando esto se logra se obtiene una monocapa celular y se dice que el cultivo está confluyente y se denomina línea celular, la cual puede ser sub-cultivada varias veces, con cada subcultivo que se realice, las células que tengan la habilidad de proliferar más rápidamente serán las que predominen gradualmente como la línea celular HEp-2 (11) manejada en el presente trabajo.

Las líneas celulares continuas son usualmente aneuploides y pueden tener un número de cromosomas entre el valor diploide o tetraploide, también existe gran variación en el número de cromosomas y, por lo tanto, en una sola población las líneas celulares que provienen de tejido canceroso como en el caso de las HeLa (cáncer de cérvix humano) y las HEp-2 (cáncer de la faringe humano) son líneas continuas infinitas y tienen todas las características de estas.

Las principales características de la línea celular HEp-2 empleadas en el trabajo son: Línea celular continua, donde se ha demostrado posibilidades de ser sub-cultivada *in vitro* por lo menos 70 veces indefinidamente, posee un crecimiento en monocapa, las células se adhieren al sustrato, creciendo y dividiéndose en una única capa celular (monocapa) siendo para este caso estacionario ya que las células incubadas sin agitación, se sedimentan y se adhieren al fondo del envase, usualmente liso (12).

3.2.1 Ventajas del Cultivo Celular

Dentro de las ventajas que posee el cultivo celular se encuentran que: permiten un control preciso y fino del medio ambiente, esto debido a que se pueden controlar las condiciones físico-químicas (pH, temperatura, presión osmótica, presión parcial de O₂ y CO₂), y fisiológicas (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, etc.). Otra de las ventajas es que permite la caracterización y homogeneidad de la muestra, ya que al ser cultivadas las líneas celulares su morfología y su composición son uniformes. La presión selectiva de las condiciones de cultivo da lugar a un cultivo homogéneo del tipo celular más vigoroso.

Por otro lado, se encuentra la economía: en los cultivos celulares se emplean disoluciones con una concentración mucho menor que en el caso del animal completo. Además, se garantiza el acceso directo de la sustancia a las células sin que se diluya y sin que sufra ningún tipo de modificación metabólica. El coste de los ensayos clínicos se reduce considerablemente y se puede hacer un mayor número de pruebas.

Una de las mejores ventajas es por cuestiones éticas: la investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo 'in vivo' pero es una alternativa válida en muchas situaciones (13).

Finalmente, las líneas celulares representan un recurso de acceso fácil como modelo para la investigación de la salud y la enfermedad, siendo capaces de proliferar de acuerdo a condiciones apropiadas de cultivo.

3.2.2 Desventajas

Entre las desventajas del cultivo celular se encuentran que es una técnica sensible: el crecimiento de las células animales se tiene que realizar en estrictas

condiciones de asepsia porque su crecimiento es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas, etc.), además, las células animales son incapaces de mantenerse vivas en ausencia de la compleja mezcla de nutrientes presente en el plasma o en el fluido intersticial. Todo esto condiciona en gran medida el instrumental requerido y el grado de preparación del personal encargado de los cultivos. También se encuentra la inestabilidad: muchas líneas celulares continuas son inestables y adoptan una dotación cromosómica aneuploide, lo que afecta tanto a su velocidad de crecimiento como a su capacidad para diferenciarse.

3.3 Línea celular HEp-2.

Las células HEp-2 (según la investigación original de Toolan (14) es un acrónimo de *Human Epidermoid carcinoma strain N° 2*, aunque actualmente se utiliza también según la connotación *Human Epithelioma*) fueron descritas por primera vez en 1952 y 1954 cuando se inoculó en ratas jóvenes, son un tipo particular de células de cultivo neoplásicas inmortalizadas conocidas como células de carcinoma epidermoide laríngeo humano, se utilizan en investigación científica y como sustrato en varios tests comerciales para anticuerpos antinucleares y son estudiadas y apreciadas en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes y en la detección y análisis de autoanticuerpos (15).

Sin embargo, tras diferentes investigaciones desarrolladas se ha encontrado, basándose en el análisis de isoenzimas, que verdaderamente derivan de células HeLa puesto que contienen marcadores cromosómicos de estas y se determinó que surgieron posiblemente como producto de una contaminación cruzada, por lo cual, estuvieron erróneamente identificadas anteriormente. La línea celular HeLa fue originada a partir de un carcinoma de cuello uterino humano y es muy utilizada en

investigaciones realizadas con cultivo celular y dado a similitudes en los patrones enzimáticos entre las células HeLa y las células HEP-2 (empleadas en el presente proyecto) se sospechaba de su contaminación, motivo por el cual se comenzaron a realizar diferentes estudios sobre sus cariotipos (16,17).

Como tal, se creía que estas células provenían de un tumor primario extirpado en el año 1952 de un paciente masculino de 57 años de edad que padecía cáncer de garganta, siendo establecida esta línea celular por primera vez por Moore, Sabachewsky y Toolan (15).

Estas células se caracterizan por servir en un sistema in vitro apropiado para el estudio y diagnóstico, además de virus, también de bacterias como *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, entre otras. Es una línea metabólicamente activa lo que favorece el cultivo de la misma para su posterior infección. Las células HEP-2 comprenden una línea celular epitelial que se caracteriza por tener una concentración elevada de antígenos, además de tener más de 46 cromosomas, dos nucléolos y poseen una gran cantidad de mitocondrias (18).

3.4 *Chlamydia trachomatis*

La *Chlamydia* es una bacteria Gram negativa, no móvil, de vida parasitaria intracelular obligada porque carece de habilidad para sintetizar ATP, son parásitos energéticos, no tienen vida libre y colonizan el citoplasma de las células susceptibles. Se han descrito variedad de especies capaces de infectar tanto a los animales como a los seres humanos, destacando en estos últimos *C. pneumoniae* y *C. trachomatis* (19), que es la especie de interés en el presente proyecto. En los cuerpos elementales (EB's), capaces de sobrevivir en el ambiente extracelular, se

encuentra DNA y RNA. La mayor parte de DNA está presente en el nucleóide central electrodensó y la mayor parte del RNA está en los ribosomas. Presentan antígenos especie-específicos y antígenos serotipo-específicos, que inducen la fagocitosis, no tienen actividad metabólica, no se pueden replicar y son infectivos. Los cuerpos reticulados (RB's) son el resultado de la diferenciación de los EB's (Figura 1).

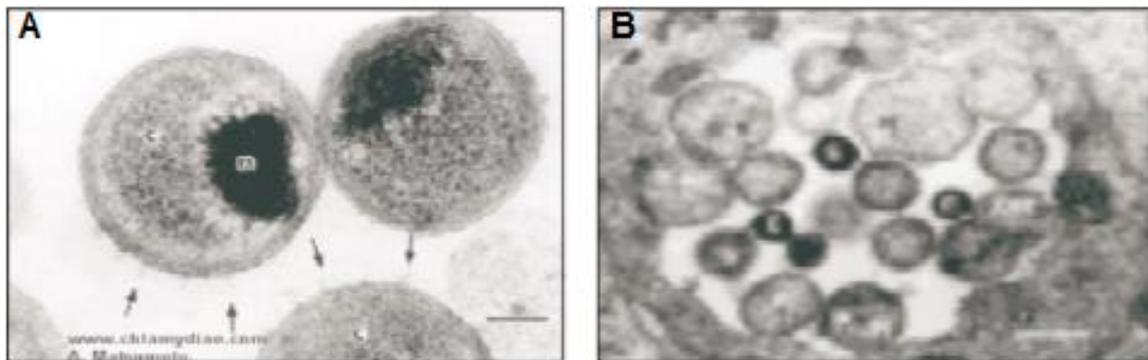


Figura 1. (A) Cuerpo elemental de *C. trachomatis*. (B) Cuerpos reticulados de *C. trachomatis*. (Fuente: Revista NOVA. 2003).

La membrana Chlamydiales propuesta por microscopía electrónica muestra dos membranas celulares trilaminares caracterizadas por la ausencia de peptidoglicanos, pero con proteínas de unión a las penicilinas. Se han realizado estudios en donde se ha demostrado que en el tratamiento con penicilina en células infectadas muestran inhibición de la división celular, pero no del crecimiento del RB con la aparición de formas Chlamydiales morfológicamente anormales y agrandadas. Los RB's son frágiles en comparación con los EB's.

La membrana presenta proteínas extracelulares ricas en cisteína, las cuales están unidas en forma cruzada mediante puentes disulfuro en los EB's para proveer una integridad estructural de resistencia frente a situaciones de estrés mecánico y osmótico. Las proteínas de la envoltura *Chlamydiales* ricas en cisteína incluyen:

MOMP (Proteína mayor de membrana externa), expresada en la

envoltura del cuerpo elemental, pesa 40 Kda, constituye casi el 60% del total de las proteínas de la membrana externa y está codificada por el gen omp1; muestra una función de porina, se glicosila post-traducción; actualmente, se ha visto que juega un rol en la adherencia electrostática y contiene epítopes antigénicos de superficie.

Proteína de 12-15 Kda: codificada por el gen omp3, es una lipoproteína hidrofílica. Los RB's no contienen esta proteína.

Proteína de 60 Kda: esta proteína está codificada por el gen omp2. Se encuentra en el espacio periplásmico, dando a la *Chlamydia* una integridad semejante a la dada por el peptidoglicano. Los RB's no contienen la proteína de 60 Kda.

Chlamydia posee proyecciones hemisféricas especializadas de superficie, cuyo diámetro es de aproximadamente 40 nm, su altura de 30 nm y la distancia entre cada una de ellas de 25 nm. Las proyecciones están separadas por pequeñas depresiones con bases planas, se cree que éstas se encuentran en la adhesión de los EB's a las células huésped. También existen proyecciones puntiagudas que son formas intermedias entre EB's y RB's, se originan debajo de las depresiones de la membrana plasmática y se extienden a través del espacio periplásmico y la membrana externa, su longitud total es de aproximadamente 90 nm, de los cuales 25 a 35 nm se proyectan más allá de la superficie de la *Chlamydia*; esto sugiere que estas «púas» podrían ser conexiones entre la célula huésped y la bacteria, así como otros componentes importantes de la envoltura Chamydial como son los lipopolisacáridos (LPS) (20).

3.4.1 Ciclo de Vida.

El ciclo de vida de *C. trachomatis*, inicia con la adhesión de la partícula metabólicamente inactiva o cuerpo elemental (EB's) a la célula huésped, esta es la partícula infectante donde para su adherencia se necesita de sulfato de heparina sobre la superficie de *C. trachomatis*, el CE se introduce por fagocitosis a la célula huésped dentro de una vacuola derivada de la membrana superficial para luego iniciar la conversión o reorganización a la partícula metabólicamente activa o cuerpo reticular (RB's), el cuerpo reticulado aumenta de tamaño y se divide varias veces por la fisión binaria. Con el tiempo toda la vacuola se encuentra llena de cuerpos elementales derivados por la fisión binaria para formar una inclusión en el citoplasma de la célula huésped y luego producir y liberar nuevos EB's. Los cuerpos elementales recién formados pueden liberarse de la célula huésped para infectar nuevas células. El ciclo de reproducción dura de 24 a 48 horas (21) (Ver Figura 2).

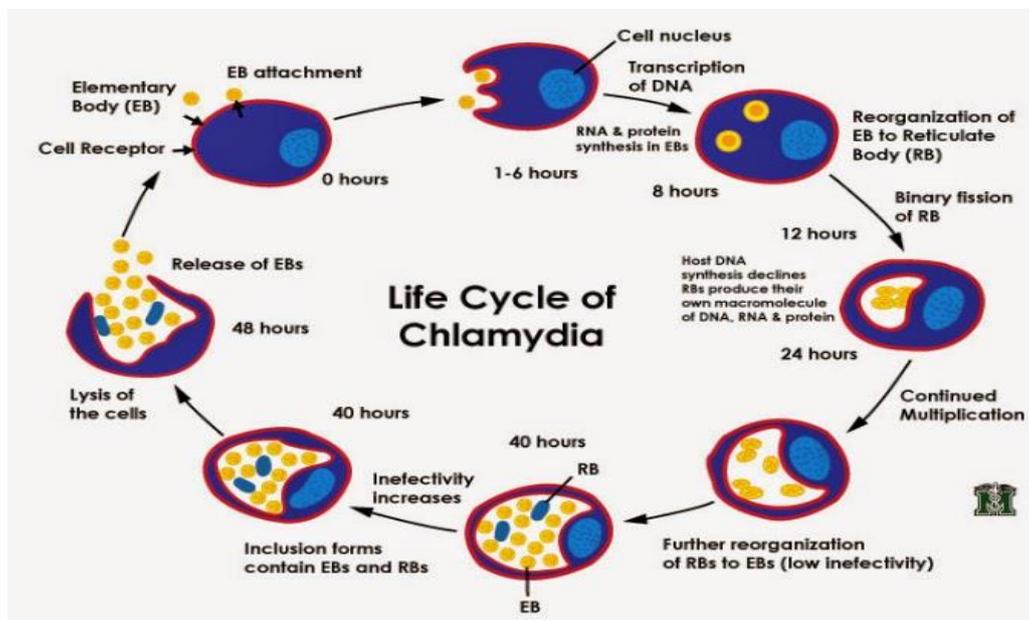


Figura 2. Ciclo de vida de *Chlamydia trachomatis*, bacteria intracelular. (Fuente: *Desenmascarando a las ITS*. 2014).

3.4.2 Interacción huésped – parásito.

La característica más notable de la infección por *C. trachomatis* es el equilibrio que con frecuencia se alcanza entre el huésped y el parásito, que resulta en una infección prolongada persistente. La propagación de una especie a otra conduce con frecuencia a la enfermedad. Este patógeno, pese a que estimula respuestas inmunes tanto humorales como celulares, puede favorecer su propia supervivencia en el huésped infectado al ocasionar ciertos cambios o alteraciones en el sistema inmune e inducir infecciones persistentes. El huésped infectado regularmente produce anticuerpos a varios antígenos de *Chlamydia* que tienen escaso efecto protector contra la reinfección. Por lo general, el agente infectante persiste en presencia de títulos aumentados de anticuerpo. Así mismo, la presencia de anticuerpos contra la proteína de Shock térmico 60 (HSP60) se considera como indicador de persistencia de la infección y, además, se asocia con mayor riesgo de carcinoma cervical.

Normalmente, en la respuesta inmune establecida para combatir una infección por *Chlamydia* participan variedad de células tales como neutrófilos, Natural Killer (NK), linfocitos T, células dendríticas y macrófagos; además, se encuentran involucrados receptores tipo Toll (TLR), interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral (TNF) y factor estimulante de macrófagos y granulocitos, e interferón gamma, entre otros (20).

3.4.3 Transmisión.

C. trachomatis es transmitida sexualmente vía vaginal, anal o en algunos casos, aunque con menor frecuencia, por infección orofaríngea. La infección causada por *C. trachomatis* resulta en una morbilidad sustancial y un costo económico en todo el mundo (23).

3.4.4 Factores de riesgo.

Asociados a la infección causada por *C. trachomatis*, se han identificado algunos factores de riesgo entre los que destaca el número de parejas sexuales, la edad, los hábitos higiénicos manejados, el uso de anticonceptivos orales, la presencia de otras infecciones de transmisión sexual y, además, el nivel socioeconómico. (22, 24).

3.4.5 Enfermedades relacionadas

Se ha encontrado causando una serie de enfermedades humanas, en las que destacan el tracoma y en general, las infecciones del tracto genitourinario (19, 27). Principalmente, se manifiesta en hombres como uretritis y tras un tiempo, puede conllevar a epididimitis y proctitis. En las mujeres, sobresale la endocervicitis y, aunque la mayoría de las mujeres son asintomáticas o presentan mínimos síntomas, pueden desarrollar enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), endometritis y entre otras cosas, embarazo ectópico e infertilidad por factor tubárico; además puede presentarse como una coinfección con *N. gonorrhoeae*. (26) En casos con lactantes de madres que presentan infección por *Chlamydia*, estos, pueden llegar a infectarse al momento del parto, resultando en conjuntivitis neonatal y/o infección nasofaríngea, que, en los recién nacidos, puede conducir a neumonitis (23, 24).

A su vez, presentar la infección por *C. trachomatis* se asocia como un factor

de riesgo para la adquisición de VIH y desarrollo de cáncer de cuello uterino, por lo que se requiere realizar un diagnóstico y tratamiento oportuno y adecuado de la población infectada para así evitar su transmisión y las diversas secuelas que pueda ocasionar (25). Cabe denotar que la mayoría de las infecciones genitales se resuelven espontáneamente sin secuelas, pero si no se tratan pueden dar lugar a complicaciones graves, principalmente en mujeres jóvenes, y a su vez, el riesgo de complicaciones puede verse aumentado con la infección repetida por esta bacteria. Respecto a lo anterior, existen algunos serotipos que afectan de forma natural al ojo (serovares A a C), mientras que otros se asocian a la infección de tejidos principalmente en la zona genital (serovariedades D, E, F, G, H, I, J y K) que en el caso de las mujeres de manera habitual es la capa de epitelio cervical y en los hombres, la uretra (19).

3.4.6 Presentación clínica.

C. trachomatis es reconocida por ser asintomática en aproximadamente 70% de las mujeres y 50% en hombres a nivel mundial. Sin embargo, respecto al porcentaje restante, los síntomas usualmente referidos cuando se presenta infección no complicada por este microorganismo son: prurito vulvar, disuria, dispareunia, aumento y alteración de la descarga vaginal, dolor abdominal, sangrado irregular y ardor pos-coito (22). En los hombres sintomáticos se suele presentar secreción uretral y disuria, a veces acompañada de dolor testicular (24).

De igual manera, debe tenerse presente que las infecciones en sitios no genitales son comunes, por ejemplo, la infección rectal, es asintomática en la mayoría de los casos, pero puede manifestarse con descargas y dolor rectal o presencia de sangre en las heces. En cuanto a las infecciones orofaríngeas, estas

pueden manifestarse como una faringitis y un dolor de garganta leve, aunque en general la aparición de síntomas es inusual. Cuando afecta a mujeres en el embarazo, se asocia con parto prematuro y bajo peso al nacer; en casos de oftalmia, los síntomas incluyen frecuentemente, secreción ocular e inflamación de los párpados (23).

3.4.7. Prevalencia en Colombia.

C. trachomatis, según un informe sobre ITS desde 1976 al 2000, en Colombia, presenta una prevalencia del 6%. Tras estudios en pacientes de una Institución de Salud de Bogotá y Medellín, se pudo determinar la infección en un rango de edad aproximado entre 30 - 39 años y en su mayoría en mujeres (en ambas ciudades), demostrando efectivamente que este sexo es el que muestra mayor riesgo frente a este microorganismo y sus diferentes efectos clínicos (25).

Según un estudio realizado en adolescentes de colegios de la provincia de Sabana Centro, Cundinamarca, se encontró que la población más afectada fue aquella de sexo femenino de la cual la mayoría presentó síntomas y en cuanto a variables de hábitos sexuales la más significativa fue el consumo de alcohol o drogas durante la última relación sexual; dado a la falta y/o baja disponibilidad de reportes y a que no se hace notificación obligatoria, se desconoce su frecuencia en la población y por ello sería adecuado que en el país se implemente un sistema de vigilancia epidemiológica para la infección por *C. trachomatis* utilizando pruebas de tamizaje no invasivas, y así establecer estrategias para su prevención en diferentes poblaciones (28, 29) (Figura 3).



ITS/R	Otras enfermedades de transmisión sexual debidas a Clamidias
ITU	Infección del tracto genitourinario inferior debida a <i>Chlamydia</i> .
IPG	Infección del pelviperitoneo y otros órganos genitourinarios debida a <i>Chlamydia</i> .
IAR	Infección del ano y del recto debida a <i>Chlamydia</i> .
ITS	Infección de transmisión sexual de otros sitios debida a <i>Chlamydia</i> .

Figura 3. Prevalencia de infecciones por *C. trachomatis* en Colombia durante el periodo 2009-2015.

3.4.8 Diagnóstico y tratamiento convencional para *Chlamydia trachomatis*.

La obtención de muestra es el factor más importante para el diagnóstico de *C. trachomatis*. Se ha demostrado que la mala calidad de las muestras clínicas afecta en especial la sensibilidad del cultivo celular y de las técnicas inmunológicas, mientras que su efecto sobre la RPC es menor. Para el diagnóstico mediante IFD, la muestra es rodada sobre un portaobjeto limpio, mientras que para ensayo inmunoenzimático (EIA) y técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos, se inocula el medio de transporte diseñado por el fabricante, sin embargo, el aislamiento en cultivos celulares sigue siendo la técnica de referencia para el diagnóstico de *C. trachomatis*.

Por otro lado, el tratamiento estándar se realiza con antibióticos,

principalmente la Azitromicina y Doxiciclina, recomendados por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Cabe notar que antibióticos de diferentes grupos son eficaces contra *C. trachomatis*, incluyendo aquí los macrólidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas, sin embargo, la erradicación de infecciones crónicas es complejo y dada la necesidad de un tratamiento prolongado aumentan las tasas de probabilidad de desarrollar resistencia a cierto tipo de medicamentos. En 1980, se describió por primera vez la reducción de la sensibilidad a la Eritromicina y más tarde hacia 1997, a la Tetraciclina, seguido del hallazgo en el 2000 de diversas cepas de *C. trachomatis* resistentes a múltiples fármacos (23, 24, 30).

En este punto, es importante reconocer que la resistencia a los antibióticos por parte de *C. trachomatis* difiere de otro tipo de bacterias y, por tanto, su sensibilidad debe estar determinada por su capacidad para proliferar dentro de una célula huésped en concentraciones variables de antibiótico (31).

3.5. *Chlamydia trachomatis* serovar L2.

Los serotipos L1, L2 y L3 de *C. trachomatis* son la causa del linfogranuloma venéreo (LGV), que es un padecimiento crónico del sistema linfático y que es transmitido sexualmente. El serovar L2 se subdivide en los subtipos L2, L2' y el L2a, con base en la diferencia en la secuencia de aminoácidos de cada uno de los subtipos. El genoma del serovar L2 se compone de un solo cromosoma circular de 1.039 Mb y un plásmido de 7499 pb, que codifica para 889 y ocho secuencias codificadoras (CDS), secuencias codificantes de proteína completa), respectivamente (Tabla 1). (32)

Serovar	D	A	L2	L2B
Cepa	UW-3	Har-13	L2/434	UCH-1
Biovariante	Genital	Ocular	Linfogranuloma venéreo	Linfogranuloma venéreo *
Tamaño (pb)	1,042,519	1,044,459	1,038,842	1,038,869
Contenido G+C (%)	41.27	41.27	41.33	41.33
Núm. de CDs	894	920	889	889
Operones rRNA	2	2	2	2
tRNA	37	37	37	37
n de pseudogenes	5	8	15	15

Tabla 1. Propiedades generales del genoma de *Chlamydia trachomatis* de diferentes serovares.

3.6 ATCC (EB's/ LGV - L2 VR 902B)

La ATCC o American Type Culture Collection es una organización sin fines de lucro que recolecta, almacena y distribuye referencias estándar de microorganismos, líneas celulares y otros materiales para investigación y desarrollo. En este proyecto se trabajó con la cepa ATCC® VR-902B™ (Tabla 2); se usó dicha cepa dado que los cuerpos elementales (EB's) son la forma infecciosa de la bacteria y permite que realice su ciclo de vida dentro de las células HEp-2 (33).

Clasificación	<i>Chlamydiaceae, Chlamydia</i>
Depositado como	<i>Chlamydia trachomatis (Busacca) rake</i>
Agente	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Línea	Linfogranuloma venereo (LGVII) línea 434
Formas de contagio	Enfermedad transmitida sexualmente
Nivel de Bioseguridad	3 (Clasificación basada en las Directrices del Servicio de Salud Pública de los U.S.A)
Formato del producto	Congelado, 1mL por vial.
Condiciones de almacenamiento	-70°C o menos.

Tabla 2. Características específicas de la cepa ATCC VR -902B.

3.7 Aplicaciones del modelo de investigación con *Chlamydia trachomatis*

Los cultivos celulares se utilizan tanto en la investigación básica como en la

aplicada, en este caso al sentar las bases para infectar células con *Chlamydia*, en la investigación básica, permite estudiar fenómenos complejos como, por ejemplo, la actividad intracelular, específicamente la transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, ciclo celular, diferenciación, apoptosis, el flujo intracelular de biomoléculas, como el procesamiento del ARN, el movimiento de las proteínas hacia diversos orgánulos y en cuanto a genómica y proteómica, el análisis genético, transformación celular, immortalización, senescencia, expresión génica, rutas metabólicas, etc (34).

También se puede estudiar sobre las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular, el estudio de las necesidades nutricionales y sobre las interacciones celulares tales como morfogénesis, proliferación celular y demás (35).

El éxito de los patógenos intracelulares como *Chlamydia*, depende de su capacidad para evadir las respuestas de defensa autónomas de las células por esto emplearon el cultivo de células HeLa e infección con *C. trachomatis* permitiendo evaluar la pérdida de CpoS en la inclusión, ya que *Chlamydia* induce la muerte rápida apoptótica y necrótica en las células infectadas. La deficiencia de CpoS produce una respuesta de interferón tipo I exacerbada que requirió una ruta de señalización del huésped. La interrupción de STING, atenuó la muerte celular, lo que sugiere que STING media la muerte celular inducida independientemente de su papel en la regulación del interferón (35).

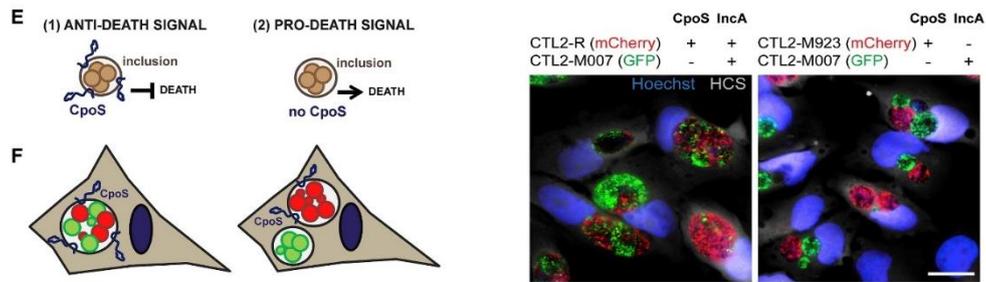
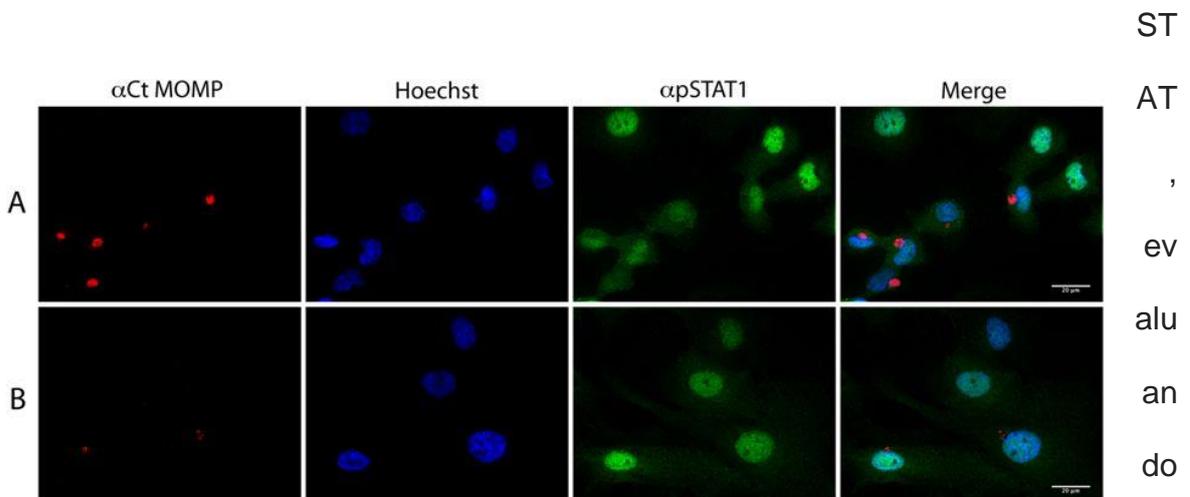


Figura 4. Modelos para la inducción de muerte celular durante la infección con mutantes *cpoS* la pérdida de estos en la inclusión provoca una muerte aumentada en las células infectadas tomado de (Fuente: *Cell Host & Microbe* 2017).

Por otra parte, el desarrollo de múltiples estudios en animales ha indicado que el IFN γ ejerce una importante defensa del huésped contra *C. trachomatis* está mediada por IFN γ que es secretada por células NK y células T en el microambiente infectado, al inducir la expresión de una enzima capaz de catabolizar el triptófano a quinurenina, la indoleamina-2,3-dioxigenasa 1, provocando un crecimiento aberrante de este microorganismo, y por tanto, desarrollando la persistencia; según lo anterior, en el trabajo de Joyce Al et al, se estudian los efectos de *C. trachomatis* en la inducción de IDO1 mediada por IFN γ a lo largo de vías de señalización celular como



tanto células infectadas como no infectadas (36).

Figura 5. La infección por *C. trachomatis* no altera la localización nuclear de pSTAT1 en células pretratadas con IFN γ . (Fuente: *Scientific Reports*. 2018).

Estos resultados muestran que *C. trachomatis* puede desarrollarse en las células cuando se agrega IFN γ en el momento de la infección, pero no cuando las células son pretratadas con IFN γ antes de la infección.

Un estudio realizado por Nogueira, et al; donde realizan la caracterización del crecimiento de *Chlamydia trachomatis* en epitelio estratificado *in vitro*, usando células HeLa y fibroblastos NIH 3T3 para ser infectadas con cuerpos elementales; para demostrar la infección por este microorganismo en las monocapas se realizó inmunofluorescencia y microscopía electrónica de transmisión con el fin de evaluar el crecimiento de inclusión y la interconversión *Chlamydia* entre el cuerpo primario y el reticulado (37) (Ver Figura 6).

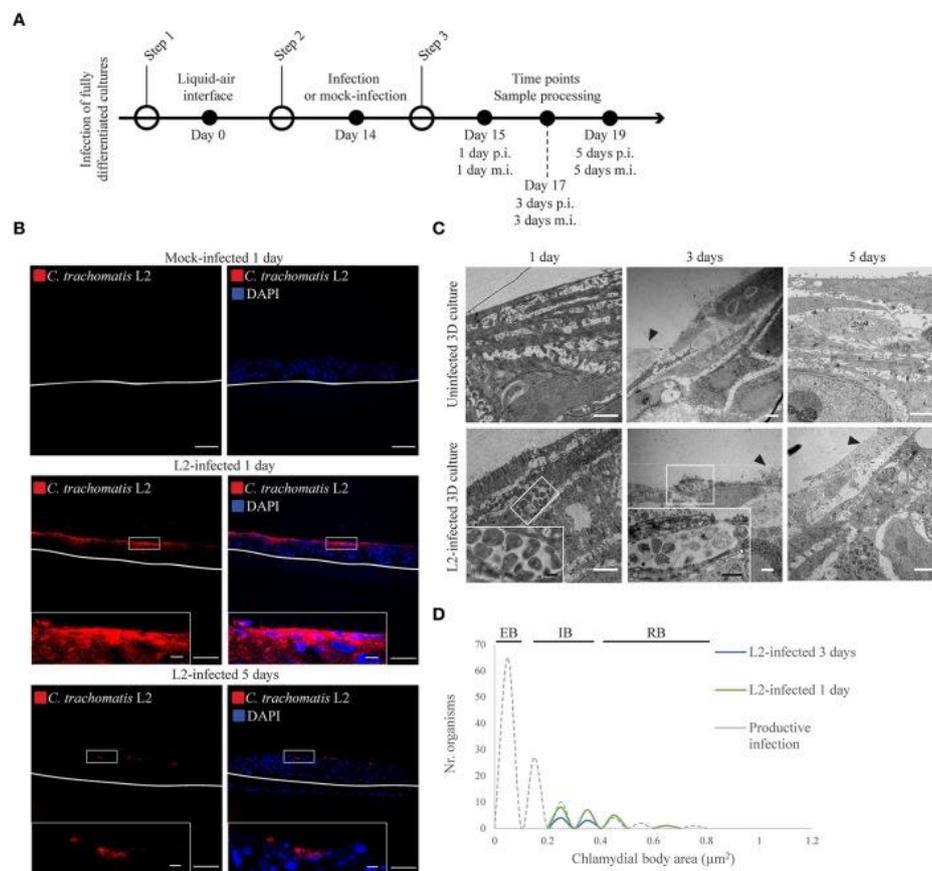


Figura 6. Diagrama de los cultivos en las etapas de diferenciación, estratificación e infección (Fuente: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017).

Como se muestra en la Figura 6, las células infectadas y tras realizar los análisis correspondientes concluyeron que el epitelio escamoso es un entorno subóptimo para el crecimiento y, por lo tanto, puede contribuir a la protección del tracto genital inferior contra la infección (38).

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Tipo y enfoque de la investigación.

Este estudio fue de tipo experimental-cualitativo longitudinal realizado en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

4.2. Universo, población y muestra

Universo: Líneas celulares y microorganismos asociado a enfermedades de transmisión sexual.

Población: Células HEp-2 y *C. trachomatis*.

Muestra: Células HEp-2 infectadas con cuerpos elementales serovar L2 cepa ATCC® VR-902B™ de *C. trachomatis*.

4.3. Hipótesis

La línea celular HEp-2 al ser expuesta a cuerpos elementales de *C. trachomatis serovar L2* (EB'S/LGV VR-902B) genera un modelo de infección.

Variable dependiente: Mantenimiento y viabilidad de las células HEp-2.

Variable independiente: Concentración de Cuerpos Elementales para infección celular.

Indicadores: La efectividad de la infección es determinada por coloración de Giemsa y la técnica de Inmunofluorescencia.

4.4 Procedimientos y técnicas.

Algunos de los procedimientos y técnicas fueron estandarizados durante el desarrollo de la fase experimental y otros tomados de la bibliografía y adecuados a los ensayos.

4.4.1 Establecimiento del cultivo de la línea celular HEp-2.

En primer lugar, las células fueron obtenidas de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) en una caja de cultivo de 25 mL con una confluencia del 80%, las células fueron despegadas con tripsina + EDTA al 0.25%, se lavaron con PBS y se sembraron en una nueva caja con el fin de ampliar y mantener la línea celular teniendo en cuenta el trabajo realizado y modificado por *Juntinico et al (21)*, las células fueron mantenidas en Medio Eagle's Modificado Dulbecco's (DMEM), suplementado con suero fetal bovino al 20% (Gibco); al alcanzar una confluencia del 90% se procedió a congelar con el fin de realizar un stock de crioviales para los diferentes ensayos y a su vez seguir manteniendo el cultivo.

Para congelar las células, se desprendió la monocapa de la placa de cultivo con tripsina + EDTA al 0,25%, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregó suero fetal bovino hasta completar un volumen final de 3 mL (el cual puede variar según el pellet observado tras la centrifugación); seguido a esto se realizó un conteo de viabilidad celular por medio del método de exclusión de Azul de Tripán. A partir de esta dilución, se tomaron 20 uL de suspensión celular y 20 uL de Azul de Tripán para ser mezclados y montar 10 uL en cada uno de los retículos de la cámara de Neubauer, y proceder al conteo de los 4 cuadrantes de las esquinas, determinando el número total de células vivas y muertas (Ver Figura 7A-B).

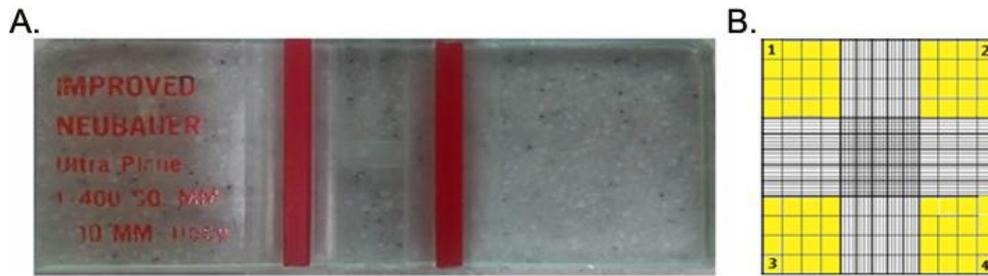


Figura 7. (A) Cámara de Neubauer. **(B)** Cuadrantes contados para conocer la viabilidad celular (Tomada por las autoras).

Para hallar el número de células vivas y muertas, se empleó la siguiente fórmula para conocer el número total de células.

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células vivas contadas}}{\text{N}^\circ \text{ de cuadrantes}} \times \text{Volumen final} \times \text{Factor de dilución} \times 10,000$$

Donde,

- **Viabilidad celular**, representa el número de células vivas presentes en la suspensión tras el conteo en la cámara de Neubauer.
- **Nº de cuadrantes**, responde a los 4 cuadrantes ubicados a las esquinas del retículo de la cámara de Neubauer que se encuentran subdivididos en 16 cuadros.
- **Volumen final**, el volumen que se obtuvo tras resuspender el pellet celular.
- **Dilución**, realizada entre una parte del volumen del pellet resuspendido y del colorante Azul de Tripán.

Luego, se dividió el número total de células obtenidas tras el conteo, por el número de viales que se emplearon para congelar, teniendo presente que en cada vial no se depositaran más de 1.5 mL de suspensión. El medio de congelación está compuesto por Suero Fetal Bovino junto al volumen resuspendido (90%) y DMSO (10%), se dispuso la cantidad de medio de congelación correspondiente y se llevó

al REVCO a una temperatura de -70°C para su conservación. El proceso descrito anteriormente se llevó a cabo durante varios días hasta completar un stock, uno de los cuatro primeros crioviales, fue descongelado con el fin de verificar el proceso de congelación.

Para descongelar las células, se tomó un criovial del REVCO dentro de un recipiente con hielo para mantener la cadena de enfriamiento evitando así daño celular por acción del DMSO, se colocó en el baño serológico a 37°C hasta que el tempano de hielo se desprendiera de las paredes del criovial e inmediatamente se agregó sobre 5 mL de Medio DMEM con SFB al 20% en un tubo Falcon de 15 mL; se llevó a centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió para proseguir con el conteo de viabilidad calculando la concentración de células vivas y muertas y así evaluar el medio de congelación (relación DMSO-SFB). El pellet resuspendido se agregó en la caja de cultivo a usar con 5 mL de medio DMEM suplementado con 20% de SFB y se mantuvo en la incubadora a 37°C con 5% de CO_2 para su crecimiento.

A partir de este proceso se comenzó a mantener y realizar pases a diferentes cajas de cultivo a los cuales se les disminuyó la concentración del SFB al 10%. Lo anterior para generar un stock celular y a partir de este llevar a cabo los demás ensayos propuestos.

En segundo lugar, para realizar la tinción de Giemsa y visualizar la morfología celular, las células fueron sembradas en placas de 6 pozos. Inicialmente, se tomaron 6 laminillas circulares de 13 mm de diámetro (Figura 8A); para su esterilización se sumergieron en etanol al 90%, se secaron con una toalla estéril cuidadosamente y colocándolas sobre una placa de Petri para someterlas a radiación UV en la cabina de flujo laminar por 45 minutos. A continuación, con

ayuda de pinzas se tomó cada una de las laminillas y se colocaron en los seis pozos de la placa de cultivo (Figura 8B), realizando el cultivo celular como se describió anteriormente, a diferencia que en este caso el volumen final de medio DMEM suplementado con SFB al 10% a utilizar fue de 3ml. Luego de realizar varios ensayos se determinó que al dispensar 250.000 células aproximadamente, pasados dos días, se obtuvo una confluencia del 80%.

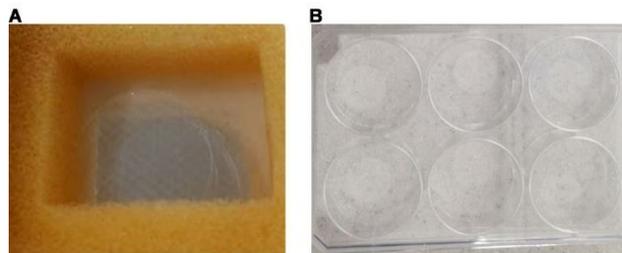


Figura 8. Laminillas de 13 mm de diámetro dispuestas en las placas de 6 pozos (Tomado por las autoras).

Para la tinción de Giemsa se empleó una solución amortiguadora (compuesta por una solución A y B) y una solución madre de giemsa (Tabla 3), posterior a esto se mezcló 2,16 mL de solución A con 0,84 mL de solución B y un 1 mL de solución madre, luego se aforo a 30 mL con agua destilada y a esta nueva mezcla se le ajusto el pH a 7.2; finalmente la solución de trabajo fue filtrada.

COLORACIÓN DE GIEMSA pH 7,2						
Solución Madre			Solución Amortiguadora (pH 7,2)			
			Solución A		Solución B	
Colorante	0.5g		Na ₂ HPO ₄	0,28 g	NaH ₂ PO ₄	0,27 g
Metanol libre de acetona	33mL		H ₂ O destilada	30 mL	H ₂ O destilada	30 mL
Glicerol	33 mL					



Tabla 3. Componentes de la coloración de Giemsa. (Tomado de Juntinico et al y modificado por las autoras). Solución de trabajo (tubo falcón 50 mL), compuesta por solución amortiguadora (Solución A y Solución B) y solución madre; metanol al 100% utilizado para fijar las células (Tomado por las autoras).

La coloración se realizó por triplicado, una vez incubadas las células, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron 3 veces con 1 mL de solución salina estéril, retirando los posibles detritos; se fijaron con metanol concentrado cubriendo la laminilla por completo durante 15 minutos, luego de esto se agregó 1 mL de la solución de trabajo a cada pozo (Figura 9A), colocándolo a una exposición de cuatro tiempos (15, 30, 40 y 60 minutos), procediendo a realizar dos lavados con solución salina durante 1 minuto cada uno para retirar el exceso de colorante (Figura 9B); las laminillas se dejaron secar unos minutos (Figura 9C) y posterior a esto, se sacaron de cada uno de los pozos y se dispusieron sobre láminas portaobjetos debidamente marcadas para ser observadas en el microscopio óptico en los objetivos 10X, 40X y 100X (Figura 9D).

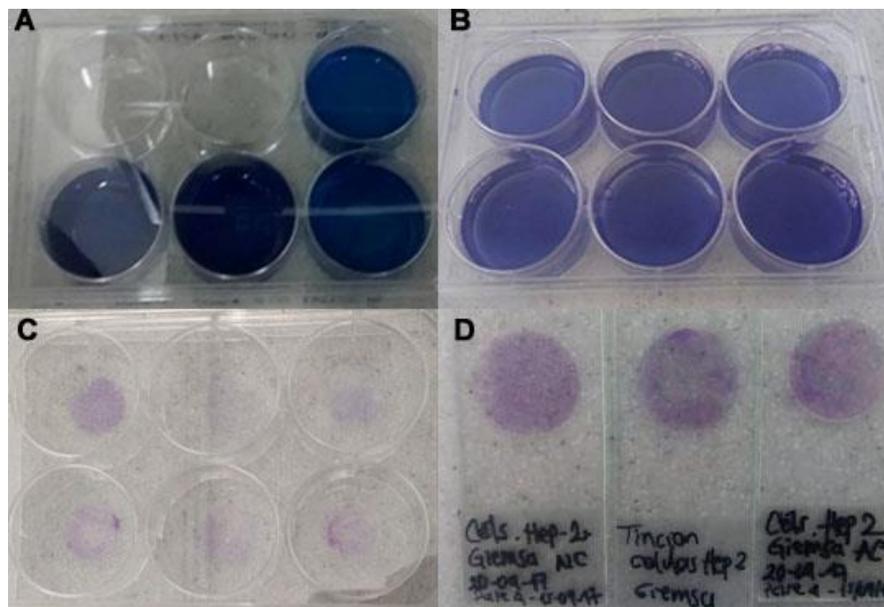


Figura 9. Coloración de Giemsa en placa de 6 pozos a células HEp-2. **(A).** Adición de 1 mL de solución de trabajo a cada uno de los pozos de la placa de cultivo. **(B).** Lavado de cada uno de los pozos para retirar exceso de colorante. **(C).** Laminillas coloreadas sobre los pozos luego de realizar los lavados. **(D).** Laminillas circulares con células HEp-2 teñidas sobre láminas portaobjetos listas para ser observadas al microscopio óptico (Tomado por las autoras).

4.4.2 Infección de células HEp-2 con *Chlamydia trachomatis*.

El grupo de Biotecnología y Genética UCMC adquirió un vial de la cepa ATCC (EB's/ LGV - L2 VR 902B), que se conservó en el REVCO a -70°C hasta su uso en el protocolo de infección. Inicialmente se realizaron alícuotas de los EB's/ LGV VR902B (1 mL de volumen total) con un total de 20 crioviales, cada uno con un volumen de 50 uL. Para poder efectuar la infección fue necesario realizar los siguientes ensayos.

En láminas portaobjetos MilliCell EZ SLIDE para cultivo celular, se sembraron diferentes concentraciones de células (previamente tripsinizadas y despegadas de las cajas de cultivo) para determinar a cuál concentración se obtenía una confluencia óptima del 90% a las 24 horas para poder realizar la infección. El ensayo para determinar la relación: Número de células – volumen se llevó a cabo realizando el recuento en la cámara de Neubauer, luego de conocer este número se empleó la siguiente fórmula:

$$V_i + C_i = V_f + C_f$$

Donde:

V_i = Volumen de la suspensión de células a hallar para dispensar en cada pozo.

C_i = Concentración de número total de células tras el recuento.

V_f = Volumen final en lámina MilliCell EZ (500 uL).

C_f = Concentración de células deseada.

Obteniendo así, que para conocer las concentraciones deseadas se reemplazó C_f por el número de células a sembrar por pozo (30, 40, 50, 60, 70 y 80 mil células) y así despejar V_i hallando el volumen en uL que se debía dispensar de

las células resuspendidas en cada pozo de lámina MilliCell EZ, despejando la ecuación de la siguiente manera:

$$V_i = \frac{V_f \cdot C_f}{C_i}$$

La coloración de Giemsa realizada en MilliCell EZ Slide presentó algunas modificaciones dado el cambio en el tamaño de la placa, siendo necesario ajustar los volúmenes para apreciar de manera óptima las células. Cabe aclarar que se mantuvo la relación de colorante de 30 partes de solución amortiguadora y 1 parte de solución madre, y el mismo tiempo de contacto, dado los resultados obtenidos inicialmente con la coloración realizada en placas de ocho pozos (Figura 10).



Figura 10. Coloración de Giemsa en MilliCell EZ Slide (Tomada por las autoras).

En este caso, se eliminó el medio de cultivo presente en cada uno de los pozos, se realizaron 3 lavados con 300 uL de PBS 1X consecutivamente durante 1 minuto cada uno, utilizando 2 gotas de metanol para fijar las células HEp-2 no infectadas durante un tiempo de 15 minutos y luego se agregó 300 uL de la solución de trabajo a cada pozo durante 1 hora como se estableció tras los ensayos anteriormente mencionados. Pasado este tiempo, se llevaron a cabo dos lavados con PBS 1X, 1 minuto cada uno y retirar de esta forma el exceso de colorante, para finalmente observarlas al microscopio óptico.

4.4.3 Protocolo de la infección.

En el primer día de infección se realizó la siembra en MilliCell EZ Slide,

teniendo en cuenta la relación volumen-concentración (como se describió anteriormente) manteniéndolas en CO₂ al 5% a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se observó al microscopio invertido (Figura 11A), para confirmar una confluencia celular del 90%, lo que permitió proseguir a realizar el ensayo de concentración de cuerpos elementales.

Para este, se emplearon los siguientes materiales: alícuotas de 50uL de cuerpos elementales de la cepa ATCC VR902B serovar L2, Buffer estéril de Sucrose-Phosphate-Glutamate (SPG) y solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (Figura 11B).

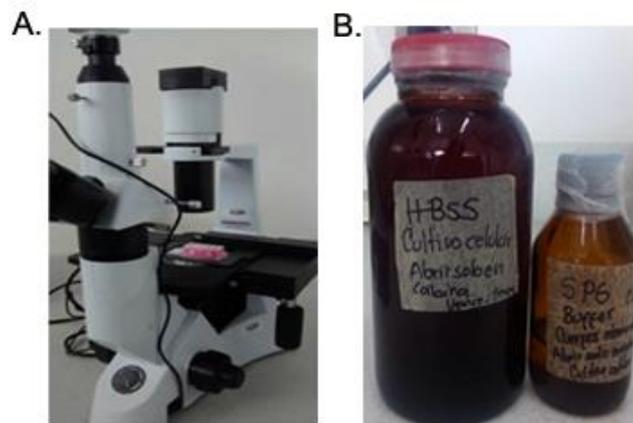


Figura 11. (A). Microscopio invertido, laboratorio de biotecnología y genética – Universidad Colegio mayor de Cundinamarca. **(B).** Soluciones protocolo de infección SPG (Sucrose-Phosphate-Glutamate Buffer) y HBSS (solución salina equilibrada de Hanks) (Tomado por las autoras).

El SPG se preparó a partir de las siguientes sustancias: Sucrosa 218 mM, KH₂PO₄ 3.8mM, K₂HPO₄ 7.2mM, L-Glutamate 4.9mM (Tabla 4), que fueron diluidas con agua destilada a 50 mL, posteriormente se ajustó el pH de la solución a 7.2 con el pH-metro, se esterilizó durante 1 hora en autoclave de vapor. Y se envasó en el frasco estéril en la cámara de flujo laminar. Se almacenó a temperatura ambiente y su caducidad es de hasta 3 meses a temperatura ambiente.

Sustancia	mM	Gr
Sucrosa	218	3.73
KH ₂ PO ₄	3.8	0.025
K ₂ HPO ₄	7.2	0.0628
L-Glutamate	4.9	0.036

Tabla 4. Preparación de SPG (Sucrose-Phosphate-Glutamate)

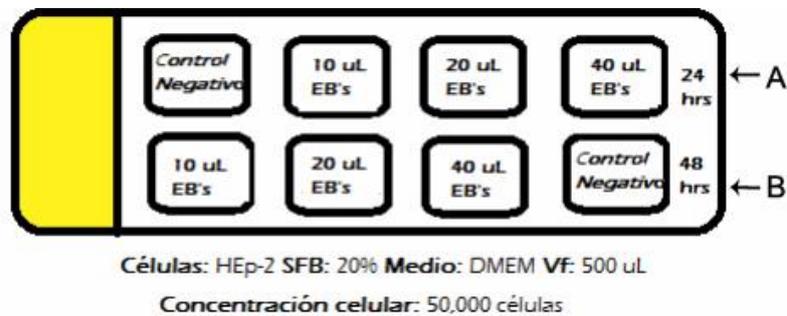
La solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) se preparó para realizar los lavados (Tabla 5) llevado a un volumen de 500 mL se ajustó el pH a 7.4 con HCl 1 M o NaOH 1 M; se esterilizó durante 1 hora en autoclave de vapor y se envasó en el frasco estéril en la cámara de flujo laminar. Se almacenó a temperatura ambiente y su caducidad es de hasta 1 mes a 4°C. Las botellas deben mantenerse bien cerradas para evitar la pérdida de CO₂ y la posterior alcalinización.

Sustancia	500 mL	1 litro
KCl	0.2g	0.40 g
Na ₂ HPO ₄	0.046 g	0.09 g
KH ₂ PO ₄	0.03 g	0.06 g
NaHCO ₂	0.175 g	0.35 g
CaCl ₂	0.07 g	0.14 g
MgCl ₂	0.05 g	0.116 MI

Tabla 5. Preparación de HBSS (Solución salina equilibrada de Hanks)

Una vez preparados los buffers se realizó el ensayo de concentración de cuerpos elementales por triplicado, donde inicialmente se retiró el medio DMEM con el que se estaban manteniendo las células y posteriormente se realizaron tres lavados con 500 uL de HBSS (Anexo 1) durante 1 minuto cada uno, esto con el fin de retirar detritos y células muertas. Una vez lavadas las células los EB's se distribuyeron en 6 de los 8 pozos de la lámina, se adicionó una concentración distinta de cuerpos elementales: a los pozos 2 y 5 una concentración de 10 uL, a los pozos 3 y 6 a una concentración de 20 uL y por último los pozos 4 y 7 con 40 uL; los 2 pozos restantes fueron empleados como controles negativos. La primera fila de pozos

se utilizó para la infección a las 24 horas mientras



se utilizó para evaluar la infección a las 48 horas que la

segunda se empleó para evaluar la infección a las 48 horas, teniendo en cuenta que cada pozo se sembró y mantuvo bajo las mismas condiciones como se observa en la Figura 12.

Figura 12. Lamina MilliCell EZ Slide empleada para determinar la concentración de EB's para obtener la mejor infección celular. Pozo 1 y 8: Controles negativos (A) Concentraciones de EB's visualizadas tras 24 h.p.i. (B) Concentraciones de EB's visualizadas tras 48 h.p.i.

Luego de adicionar los Cuerpos Elementales de *Chlamydia trachomatis* a los

cultivos de células, se les agregó SPG estéril (Anexo 2) de manera tal que cada pozo se completó a un volumen de 100 uL (Figura 13). Posteriormente, se llevó a incubar a 37°C en CO₂ al 5% durante 1 hora y 20 minutos, tiempo tras el cual se agregó 300 uL de medio DMEM suplementado con 20% de SFB a cada uno de los pozos, incluyendo los controles negativos, para un volumen final de 400 uL. Esto, se llevó nuevamente a incubar a 37°C en CO₂ al 5% y se evaluó a las 24 horas post-infección (h.p.i) y a las 48 h post-infección (h.p.i).

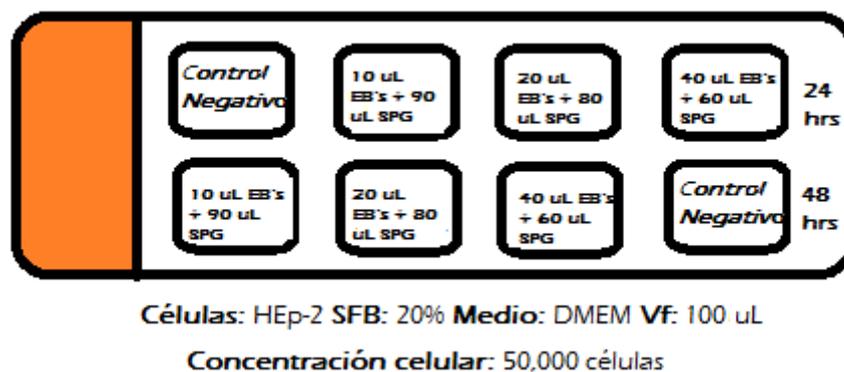


Figura 13. Lamina Millipore EZ Slide empleada para determinar la concentración de EB's, relación SPG y EB's para cada pozo en volumen (uL). Concentraciones de EB's visualizadas tras 24 h.p.i y 48 h.p.i.

Al tercer día pasadas las 24 horas post-infección, se eliminó el medio DMEM contenido en cada pozo en la fila A, se lavaron las células 3 veces empleando HBSS y se fijaron con 2 gotas de metanol al 100%, luego se incubó nuevamente la lámina para que continuara el proceso de infección hasta cumplir las 24 horas restantes. En el cuarto día, en la fila B se empleó el mismo procedimiento realizado el día anterior, dejando a -4°C la lámina fijada. Finalmente, en el quinto día se realizó la tinción de Giemsa a los 8 diferentes pozos, agregando 300 uL de colorante a cada uno durante 1 hora y se observó al microscopio.

Por otro lado, se revisaron y analizaron varios protocolos para la recuperación de cuerpos elementales, seleccionando dos, de lo cual al establecer un modelo de infección de células HEp-2 con *Chlamydia trachomatis* es indispensable para posteriores estudios.

Protocolo N° 1

Se toma el contenido de las cajas de cultivo, se sonica durante 5 minutos y se centrifuga a 500xg durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se centrifuga nuevamente a 10.000xg durante 30 minutos a 4°C y el pellet restante se resuspende en un buffer compuesto por sacarosa, fosfato y glutamato (SPG). Se aíslan los EB's de esta preparación mediante purificación sobre un gradiente de Renografin. Los EB's purificados se suspenden en SPG, se dividen en alícuotas y se almacenan finalmente a -80 ° C. (39)

Protocolo N° 2

Las monocapas celulares se rompen con perlas de vidrio, tomando el medio que contiene los restos celulares, se sonica brevemente y se centrifuga a 50 xg durante 5 minutos a 4°C para eliminar las células. El sobrenadante se elimina y centrifuga a 12.000 xg. El sedimento obtenido se resuspende mediante sonicación en Tris / KCL y se colocan 25 ml de inóculo en 10 ml de Gastrografin® al 40%, se centrifuga a 20.000 rpm a 4°C durante 45 minutos. El sedimento se vuelve a suspender en 1 ml de Tris / KCL, se estratifica en un gradiente discontinuo (54%, 44%, 34% de Gastrografin®) y se centrifuga a 20.000 rpm a 4°C durante dos horas.

La interfaz entre las capas de 44% y 54%, que contiene los EB, se elimina cuidadosamente. Los EB's se lavan mediante resuspensión en 10 ml de Tris KCL y centrifugación a 20.000 rpm a 4°C durante 45 minutos más, para eliminar las trazas residuales de Gastrografin®. El sedimento final se resuspende por sonicación en 10 ml de medio de transporte de Chlamydia (sacarosa 218 mM, KH₂PO₄ 3,76 mM, K₂HPO₄ 7,1 mM, ácido L-glutámico 4,9 mM, FBS al 10%, gentamicina 0,05 mg / ml, estreptomycin 0,1 mg / ml, 150 N / ml de nistatina) y las alícuotas se almacenan a -80°C. (40)

4.4.4 Inmunofluorescencia directa

Para demostrar y corroborar la infección de células HEp-2 con *Chlamydia trachomatis* serovar L2 se desarrolló la técnica de Inmunofluorescencia directa, por medio de un anticuerpo primario policlonal de conejo: "Rb pAB to *Chlamydia trachomatis* (FITC) **ab21211**" dirigido contra la proteína de membrana **MOMP** de *Chlamydia trachomatis*. Este anticuerpo consta de una fracción de IgG purificada acoplada covalentemente con isómero I de isotiocianato de fluoresceína de alta pureza (41); fue adquirido por el Grupo de Biotecnología y Genética y se conservó en una nevera a -20°C hasta ser empleado en este procedimiento.

Células HEp-2 fueron cultivadas en MilliCell EZ slides e infectadas con EB's de *Chlamydia trachomatis*, se retiró el medio DMEM presente en los pozos y poder realizar 3 lavados con PBS cada uno durante 1 minuto. Posteriormente las células se fijaron continuamente a las 24 y 48 h.p.i con 200 uL de metanol frío (mantenido a -20°C) al 100% durante 10 minutos, tiempo tras el cual se realizaron nuevos lavados con PBS y se adicionó 100uL de Cloruro de amonio 50 uM durante 5 minutos con el fin de eliminar las trazas de metanol que no fueron removidas por medio de los lavados realizados previamente. Luego de este tiempo se lavó nuevamente cada

pozo y se agregó saponina al 0,1% por 10 minutos permeabilizando la membrana celular, se procedió a realizar el bloqueo con una solución de PBS al 1% de SFB durante 20 minutos y finalmente se preparó una dilución del anticuerpo 1:100 para adicionar en cada pozo, tomando 6uL de Anticuerpo y completando con 594 uL de PBS. Se mantuvo la lámina durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C, se retiró el anticuerpo diluido realizando lavados con PBS y se observó en el microscopio de fluorescencia Leica DM2500.

Además, se adicionó 100 uL de colorante Hoechst, para tinción de núcleo y nuevamente se realizaron lavados para visualizar cada pozo al microscopio. Las imágenes se capturaron utilizando Leica DFC425 C, con los filtros I3 y A, con rangos de excitación de 565 +/-25 y 360 +/- 20 y luz de color Verde y Azul respectivamente.

4.5 Evaluación estadística de los datos obtenidos.

La evaluación estadística de los datos obtenidos se realizó a través del software **InfoGram©**.

5. RESULTADOS

Para establecer el protocolo óptimo de infección en células HEp-2 con EB's de *C. trachomatis* serovar L2, fue necesario adecuar el cultivo de la línea celular con una buena viabilidad y confluencia del 90%. De esta manera se pudieron ejecutar los diferentes ensayos, utilizando un número apropiado de células por pozo (MilliCell EZ Slide), cuerpos elementales y se logró demostrar la infección través de una coloración apropiada.

5.1 Cultivo de la línea celular HEp-2.

Para realizar la infección fue preciso disponer de cultivos celulares que permitieran un desarrollo óptimo de los EB's; por tal motivo, fue indispensable evaluar el proceso de congelación como primera medida con el objeto de asegurar que el mantenimiento de las células para los ensayos fuera el adecuado y poder generar un stock. Una vez realizados los congelamientos de las células, se realizó una prueba con varios de los crioviales para observar si el procedimiento empleado fue efectivo y permitía conservar la viabilidad celular mientras se mantenían a -70°C . Con el método de Azul Tripán las células vivas se observan refringentes por su capacidad de excluir el colorante (Figura 14A), mientras que las células muertas se

observan de color azul dado a que por daños en su membrana son capaces de captar el colorante (Figura14B).

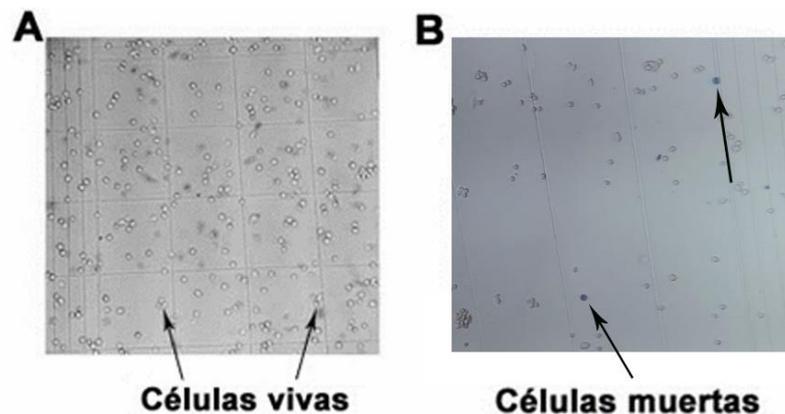
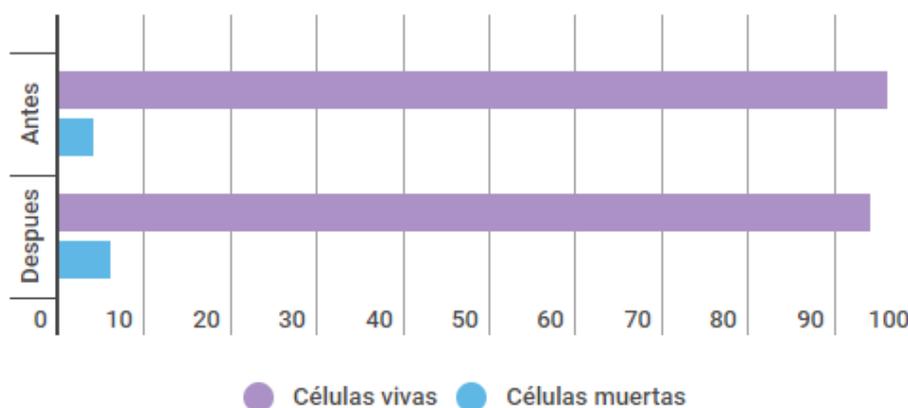


Figura 14. *Conteo de viabilidad celular en cámara de Neubauer por el método de Azul de Tripán. (A). Se observan células vivas. (B). Las flechas señalan las células muertas encontradas en la preparación (Tomadas por las autoras).*

La viabilidad se realizó antes y después de cada congelamiento. Al desprender las células y tripsinizarlas, las viabilidades por el método de exclusión en cámara de Neubauer, arrojaron en promedio un 95-98% de células vivas y un 5-2 % de células muertas. Después del descongelamiento, en promedio se observaron entre el 92% - 97% de células vivas y del 8%-3% de células muertas (Gráfica 1), por lo que se determinó que el procedimiento de congelación fue apropiado respecto a la relación SFB y DMSO como medio empleado para este fin; se continuó trabajando de la misma manera hasta obtener un stock de crioviales.



Gráfica 1. Viabilidad celular por el método de Azul de Tripán, Antes de ser congeladas y después de ser congeladas (Eje Y), Células vivas VS Células muertas (Eje X).

Para realizar los ensayos de infección, se descongelaron células HEp-2 que fueron cultivadas con medio DMEM, SFB al 20% sin la adición de antibiótico, por lo cual se les realizó un seguimiento diario con el fin de observar el viraje del medio que permite determinar: la confluencia celular, presencia de detritos, viabilidad celular y posible contaminación, siendo un factor a evaluar en cada uno de los cultivos de la línea HEp-2.

Los cultivos realizados fueron monitoreados diariamente, mediante el microscopio invertido durante 72 horas. Al consumir los nutrientes proporcionados en el medio de cultivo las células tienden a generar un cambio de color por el indicador de pH Rojo de Fenol, presente en el medio DMEM. El pH correcto es crítico para la función y adhesión celular; el medio vira a un color amarillo a pH (<6.8) y cambia a fucsia a medida que aumenta el pH (>8.2). En general, un color rojo-naranja indica condiciones de pH óptimas para el crecimiento celular (7,0 a 7,7). Un pH ácido evidencia la acumulación de metabolitos por cultivos que han crecido demasiado densos o por bastante tiempo en el mismo medio. Este viraje es resultado del metabolismo celular y presencia de detritos capaces de lisar la monocapa y provocar una pérdida de adherencia, ya que reducen la viabilidad celular; concluyendo así que a mayor confluencia mayor es el metabolismo y viraje del medio (Figura 15).



Figura 15. Viraje del medio DMEM en las cajas de cultivo a causa del metabolismo de las células HEp-2 sembradas (Tomadas por las autoras).

La confluencia es uno de los parámetros claves en la infección, esta se evaluó con un ensayo en donde se colocaron aproximadamente 1'382,000 células vivas (92.1%) frente a 118,000 (7.8%) células muertas, siendo cultivadas en un frasco de 25 ml. A las 0 horas se apreciaron suspendidas en el medio de cultivo (Figura 16A), trascurridas 24 horas comienza a observarse células adheridas formando la monocapa con una confluencia del 30% (Figura 16B), a las 48 horas se presentó una confluencia del 60% (Figura 16C) y por último a las 72 horas las células se encontraron en gran número con una confluencia del 90% (Figura 16D). Estos cambios se vieron reflejados en el viraje del medio.

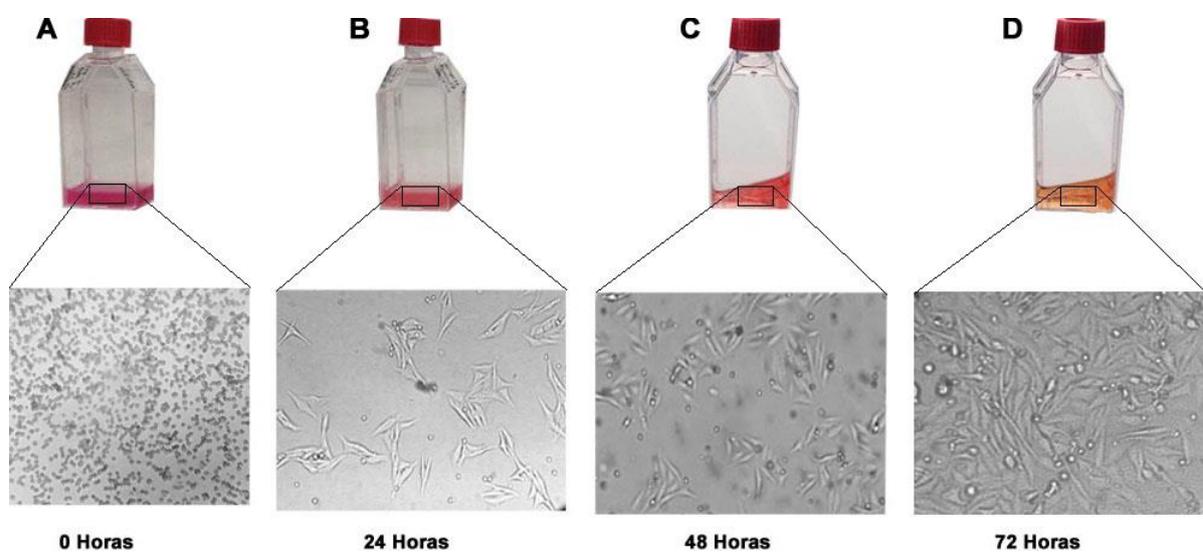


Figura 16. Viraje del medio DMEM vs confluencia de las células HEp-2 observadas al microscopio invertido en objetivo de 10X a diferente hora desde su siembra. (A). Células a

las 0 horas, en suspensión. **(B)**. Células a las 24 horas, confluencia del 30%. **(C)**. Células a las 48 horas, confluencia del 60%. **(D)**. Células a las 72 horas, confluencia del 90% (Tomadas por las autoras).

La confluencia del 90% fue evaluada al microscopio invertido antes de cada ensayo, ya que es la ideal para despegar las células y realizar un subcultivo o proceder a congelarlas, en este punto las células se encuentran formando la monocapa estando muy juntas entre sí (Figura 17 A-C), además es la confluencia ideal para realizar el protocolo de infección.

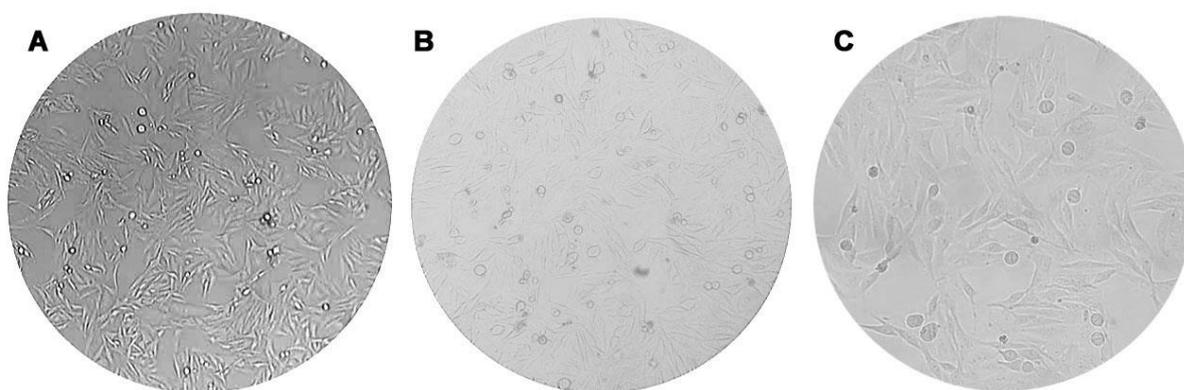


Figura 17. Células HEp-2 con el 90% de confluencia en diferentes aumentos observada al microscopio invertido **(A)**. Se observa la confluencia entre las células, monocapa de células en la placa en un aumento de 10X. **(B)**. Se observa un campo en el cual las células están con gran confluencia en objetivo de 40X **(C)**. Se observan células HEp-2 confluentes en objetivo de 40X (Tomadas por las autoras).

Finalmente, se estableció que los crioviales deben ser congelados con un número mínimo de 1'000.000 a 1.500.000 de células, a partir de esto y tras realizar varios sub-cultivos se obtuvo un stock de aproximadamente 100 crioviales de células HEp-2 recolectadas y almacenadas a -70°C en el REVCO, para ser utilizadas en los diferentes ensayos. (Figura 18).



Figura 18. Stock de células HEp-2, crioviales mantenidos a -70°C en el REVCO.

5.2 Coloración de Giemsa

Para evaluar la infección en la línea celular HEp-2 fue necesario implementar un protocolo de coloración que permitiera diferenciar correctamente la morfología de las células infectadas y no infectadas, reconociendo de este modo las estructuras presentes en cada ensayo.

El colorante de Giemsa es una solución en metanol de un colorante ácido (eosina) y un colorante básico (azul de metileno), que permite observar las estructuras celulares dependiendo de su carácter ácido o básico, motivo por el cual se utilizaron diferentes tiempos de exposición de la solución de trabajo (15, 30, 40 y 60 minutos). Al realizar la tinción con Giemsa, todas las células expuestas al colorante fueron observadas en microscopio óptico.

Como se observa en la Figura 19A, a los 15 minutos, las células que fueron sembradas en placas de 6 pozos sobre laminillas circulares captan el colorante débilmente y no es posible diferenciar estructuras celulares. En la Figura 19B, en las células sometidas a 30 minutos, el colorante no permeabiliza el núcleo pero sí el citoplasma, por lo que permite apreciar de manera clara solo algunas estructuras, a los 40 minutos (Figura 19C), las células van adquiriendo mejor el colorante de modo tal que se comienza a diferenciar el citoplasma, núcleo y nucléolos, pero el color se observa de forma neutral; por último a los 60 minutos (Figura 19D) se logró

diferenciar la morfología de las células HEP-2 no infectadas, captando el colorante con la misma tonalidad en los diferentes campos de la lámina.

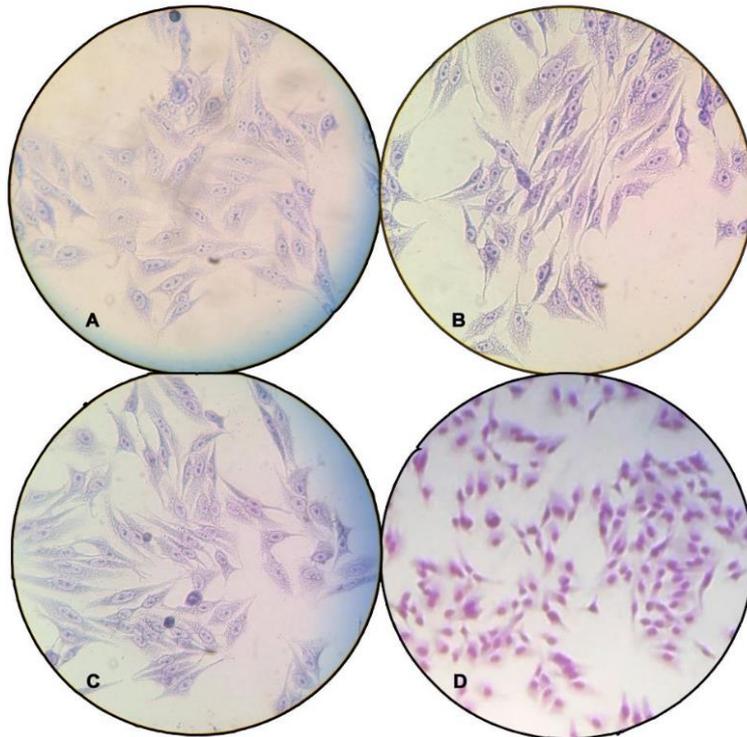


Figura 19. Coloración de Giemsa a células HEP-2 en diferentes tiempos de tinción. **(A).** 15 minutos, **(B).** 30 minutos, **(C).** 40 minutos, **(D).** 60 minutos, coloreadas con solución de trabajo a una concentración de 30 partes de Solución amortiguadora y 1 parte de solución madre.

Tras probar los diferentes tiempos de tinción, se determinó que el tiempo de **60 minutos** de contacto del colorante con las células fijadas, es con el que se obtuvo una coloración ideal que permitió diferenciar y observar definitivamente el citoplasma, núcleo y nucléolos de las células HEP-2, a través del microscopio óptico (Figura 20).

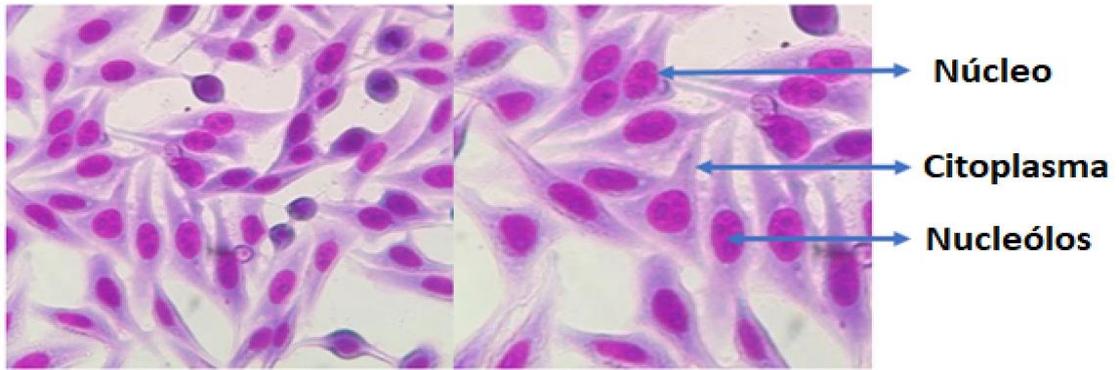


Figura 20. Células HEp-2 teñida con Giemsa en objetivo de 40x presentando la descripción de las partes celulares observadas tras la coloración. (Tomada por las autoras).

La coloración fue confirmada nuevamente con una exposición al colorante de 60 minutos para distinguir sus características morfológicas y se evaluaron nuevamente en diferentes aumentos al microscopio óptico (Figura 21 A-D)

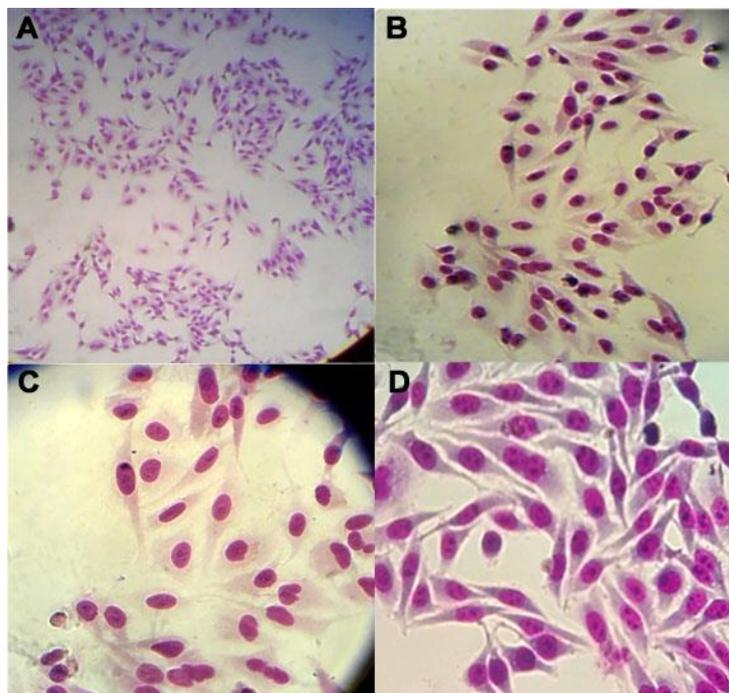


Figura 21. Coloración de Giemsa aplicada a células HEp-2 en diferentes aumentos al microscopio óptico estandarizada a 60 minutos de exposición al colorante. **(A).** Células HEp-2 en aumento de 10x. **(B).** Células HEp-2 en aumento de 20x. **(C)** y **(D).** Células HEp-2 en aumento de 40x, distintos campos.

5.3 Infección de células HEp-2 con *Chlamydia trachomatis*

Para realizar el protocolo de infección las células HEp-2 fueron cultivadas empleando medio DMEM con SFB al 20% con variación del uso de *Gentamicina* como antibiótico, se determinó la concentración de células y EB's para la infección, comprobándose con la coloración estandarizada de Giemsa.

5.3.1 Determinación de la concentración celular

La infección se realizó en láminas MilliCell EZ, por lo cual se determinó el número de células a adicionar en cada pozo de la lámina, se procedió a realizar varios ensayos sembrando diferentes cantidades de células por pozo (desde 30,00 a 80,000 células), determinando la cantidad optima de células para obtener una confluencia de 90% a las 24 horas e infectarlas con EB's de *C. trachomatis*.

Para conocer el volumen de células a dispensar en cada pozo ($V_{inicial}$) se empleó la formula mencionada en metodología (4.4.2.1). A continuación, se muestran los valores calculados para uno de los ensayos, teniendo en cuenta valores constantes como la concentración inicial (C_i): aproximadamente 490,000 células en suspensión obtenidas del cultivo y el volumen final para cada pozo (V_f) 500 uL, siendo el volumen inicial (V_i) dependiente de la concentración final (C_f), como lo muestra la Tabla 6.

$V_{inicial}$	$C_{inicial}$	V_{final}	C_{final}
31 uL	490,000 cél	500 UI	30,000 cél
41 uL	490,000 cél	500 UI	40,000 cél
51 uL	490,000 cél	500 UI	50,000 cél
61,2 uL	490,000 cél	500 uL	60,000 cél
71,4 uL	490,000 cél	500 uL	70,000 cél

82 uL	490,000 cél	500 uL	80,000 cél
-------	-------------	--------	------------

Tabla 6. Concentración en uL de células en suspensión a adicionar por pozo.

El diseño experimental que se utilizó para la infección se muestra en la Figura 22A, como la lámina consta de 8 pozos se manejaron 2 pozos de control con medio DMEM con SFB al 20% y los 6 restantes se emplearon para dispensar diferentes concentraciones celulares mostradas en la Tabla 6 (C_i) y a cada pozo se adicionó DMEM suplementado con 20% de SFB para completar un volumen final de 500 uL (V_i) (Figura 22B).

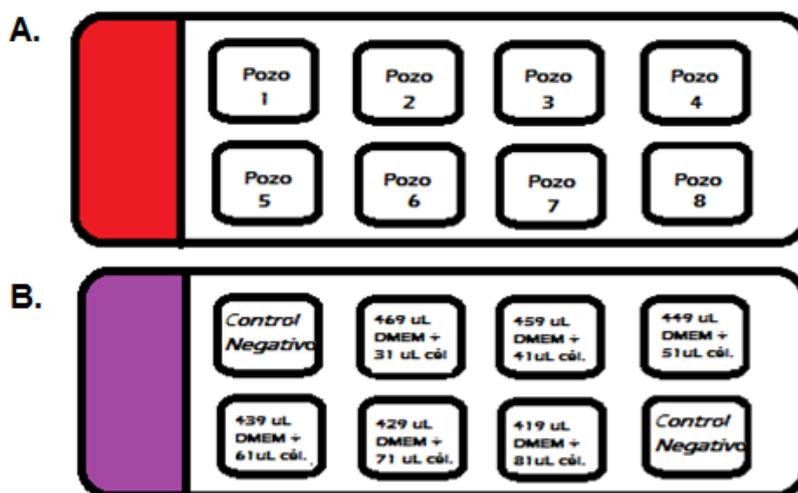


Figura 22. Lamina MilliCell EZ Slide empleada para determinar la concentración celular. **(A).** División y referenciación de los pozos de la laminilla MilliCell EZ Slide. **(B).** Concentraciones de medio y células para cada pozo en volumen (uL); Pozo 1 y 8: Controles negativos.

Este ensayo permitió determinar que la concentración celular con una confluencia del 90% óptima para la infección y presentada a las 24 horas post-cultivo estaba entre **50,000 a 60,000 células** sembradas en el pozo. Lo anterior fue valorado a través del microscopio invertido como se muestra en la Figura 23.

1	2	3	4
Control de medio	30,000 células	40,000 células	50,000 células

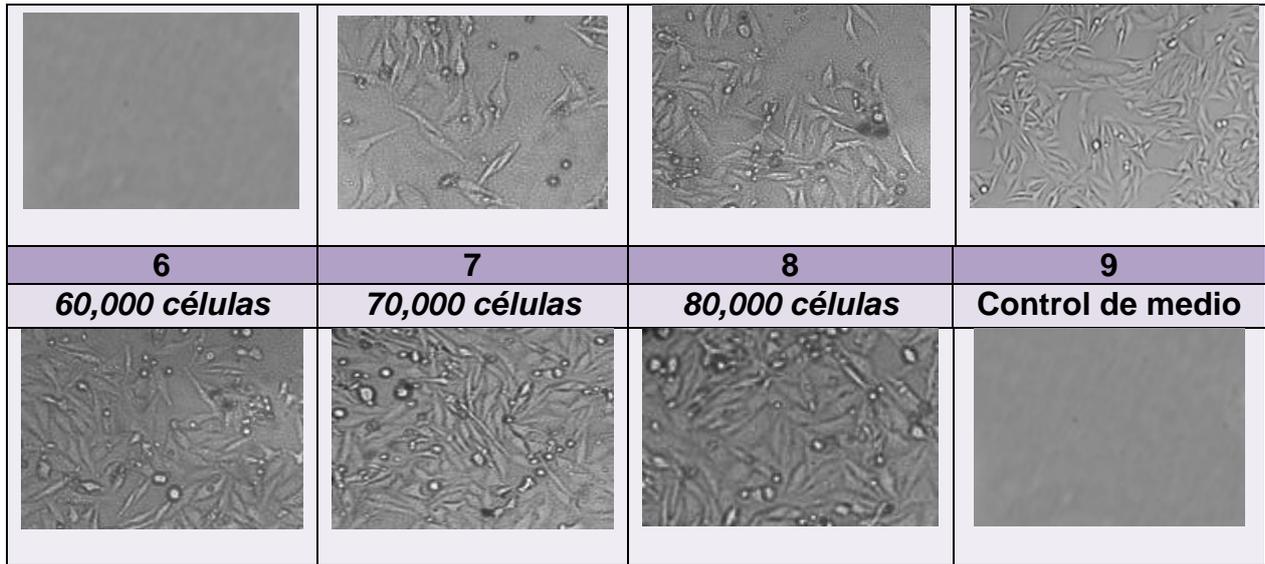
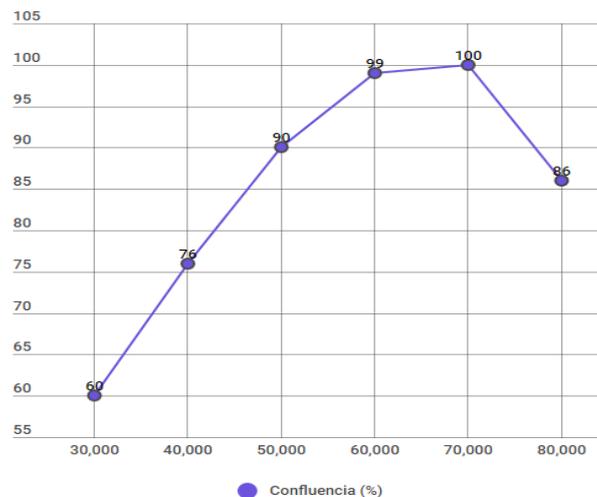


Figura 23. Visualización de las concentraciones celulares a través del microscopio invertido.

Al observar el crecimiento celular (porcentaje de confluencia VS concentración celular), se encontró una relación proporcional: A mayor número de células mayor confluencia, considerando que a una concentración de 80000 células esta relación varía ya que la confluencia disminuye y por ende se presenta un mayor porcentaje de células no adheridas en los pozos de la laminilla MilliCell EZ Slide (Gráfica 2).



Gráfica 2. Crecimiento celular. Porcentaje de confluencia (Eje Y) VS Concentración celular (Eje X).

Para definir la concentración de células a utilizar en la infección, se repitió el ensayo con las dos concentraciones seleccionadas. Se manejaron los pozos 1 y 8 como control de medio (DMEM al 20% de SFB), los pozos del 2 al 4 fueron sembrados con una concentración de 50.000 células y los pozos 5 al 7, sembrados con 60.000 células (Figura 24).



Figura 24. Lamina MilliCell EZ Slide empleada para determinar la concentración celular entre 50,000 y 60,000 células. Pozo 1 y 8: Controles negativos.

A partir de este ensayo se concluyó que la cantidad de células con las que se presentó la mejor confluencia (90%) para realizar la infección con Cuerpos Elementales de *C. trachomatis* serovar L2, es de **50,000 células** por pozo. En comparación, la concentración de 60.000 células por pozo presentó un mayor número de células muertas reflejando pérdida de adherencia, por lo que no se eligió como la concentración adecuada (Figura 25).

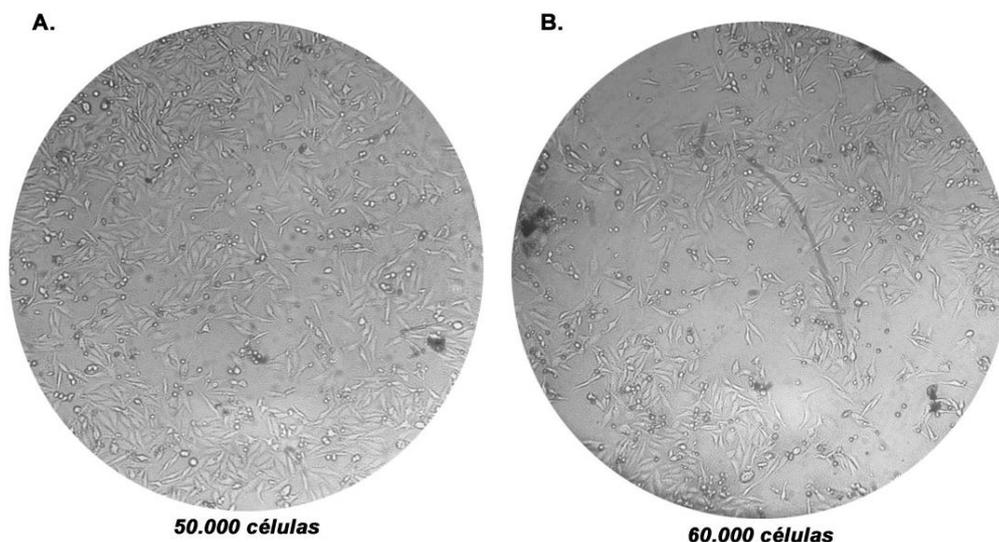


Figura 25. Concentración de células HEP-2 visualizada al microscopio invertido. **(A).** Concentración de 50.000 células con una confluencia del 90%. **(B).** Concentración de 60.000 células con una confluencia del 80%.

Finalmente, se observó la morfología de las células HEP-2 en las placas de MilliCell EZ Slide. Las diferentes concentraciones celulares se colorearon con Giemsa a un tiempo de exposición de **60 minutos** como se había determinado anteriormente y fueron visualizadas en microscopio óptico a diferentes objetivos, presentando una morfología bien definida.

5.3.2 Infección de las células Hep2

Para conocer el número aproximado de la concentración de EB's en el vial de 1 mL se realizó un conteo en la cámara de Neubauer, donde se observaron los EB's circunferentes, pequeños y refringentes (Figura 26), sin embargo tras realizar un segundo conteo con el fin de corroborar el número de cuerpos elementales contados inicialmente se observó una notable disminución en este, por lo que se procedió a realizar el conteo nuevamente sin hallar ningún cuerpo elemental, lo que permite inferir que los EB's son muy lábiles y el ambiente no favoreció su supervivencia, confirmando la necesidad que tienen los EB's de infectar células y encontrarse en un microambiente adecuado para desarrollar así su ciclo de vida.

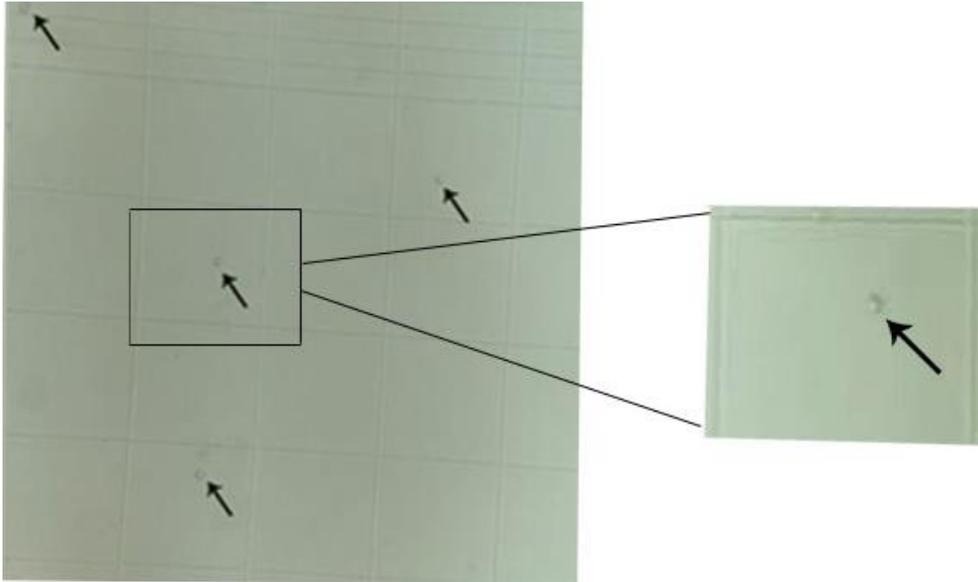
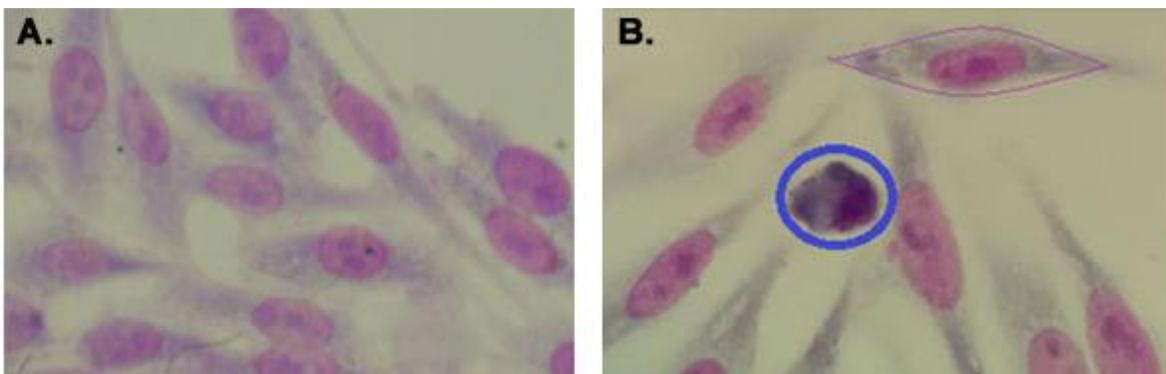


Figura 26. Cuerpos elementales de *C. trachomatis* vistos en cámara de Neubauer al microscopio invertido en objetivo de 10X. Las flechas señalan los EB's vistos en cada campo.

Para desarrollar el protocolo de infección en células HEp-2 se utilizaron tres volúmenes diferentes de EB's (10 uL, 20 uL y 40 uL) con el fin de evaluar la infección cuerpo-célula durante 24 y 48 horas post-infección. Al colorear con



Giemsa se observó que los cuerpos elementales presentan una morfología circular con una masa central de material electro denso de color púrpura, por lo que es importante diferenciar la morfología de las células HEp-2 frente al del cuerpo elemental. Observaciones hechas a partir de los controles negativos y los pozos de infección. (Figura 27)

Figura 27. Células HEp-2 teñidas con coloración de Giemsa visualizadas al microscopio óptico en objetivo de 100x, **(A)** Control negativo: Células HEp-2 sin infectar. **(B)** Diferencia entre una célula (demarcada en color morado) adherida formando monocapa con citoplasma, núcleo y nucléolos característicos y cuerpo elemental (demarcado en color azul) con su forma ovoide.

A los dos tiempos valorados post-infección (24 y 48 horas) se les realizó un conteo para evaluar la concentración de EB's en 25 células por campo en objetivo de 40X. En la tabla No 7, se muestran los resultados promedio del conteo de 10 campos observados.

CONCENTRACIÓN	24 HORAS	48 HORAS
	(Rango de EB's en 25 células por campo)	(Rango de EB's en 25 células por campo)
10 uL	6-8	10-12
20 uL	12-14	16-18
40 uL	18-20	22-24

Tabla 7. Rango de EB's en 25 células a 24 hrs y 48 hrs post infección en las 3 concentraciones.

A partir de los datos mostrados en la tabla 7 se calculó un promedio de los EB's para 50,000 células, siendo este el total de células sembradas aproximadamente en cada pozo (Tabla 8). Demostrándose que a las 24 horas se observan menos cuerpos elementales que a las 48 horas.

CONCENTRACIÓN	24 HORAS	48 HORAS
	(Rango aprox. de EB's en 50,000 células)	(Rango aprox. de EB's en 50,000 células)
10 uL	12,000-16,000	20,000-24,000
20 uL	24,000-28,000	32,000-36,000

40 uL	36,000-40,000	44,000-48,000
--------------	---------------	---------------

Tabla 8. Rango aproximado de EB's en 50,000 células por pozo.

Una vez realizado el protocolo de infección las células fueron evaluadas en un microscopio óptico (Figura 28), el ensayo conto con dos controles negativos donde se aprecia la morfología celular sin lisis o daño y no se evidencian estructuras anexas distintas a las células HEp-2. En los pozos infectados se aprecian los cuerpos elementales anteriormente descritos, en diferente concentración respecto a las células encontradas por campo.

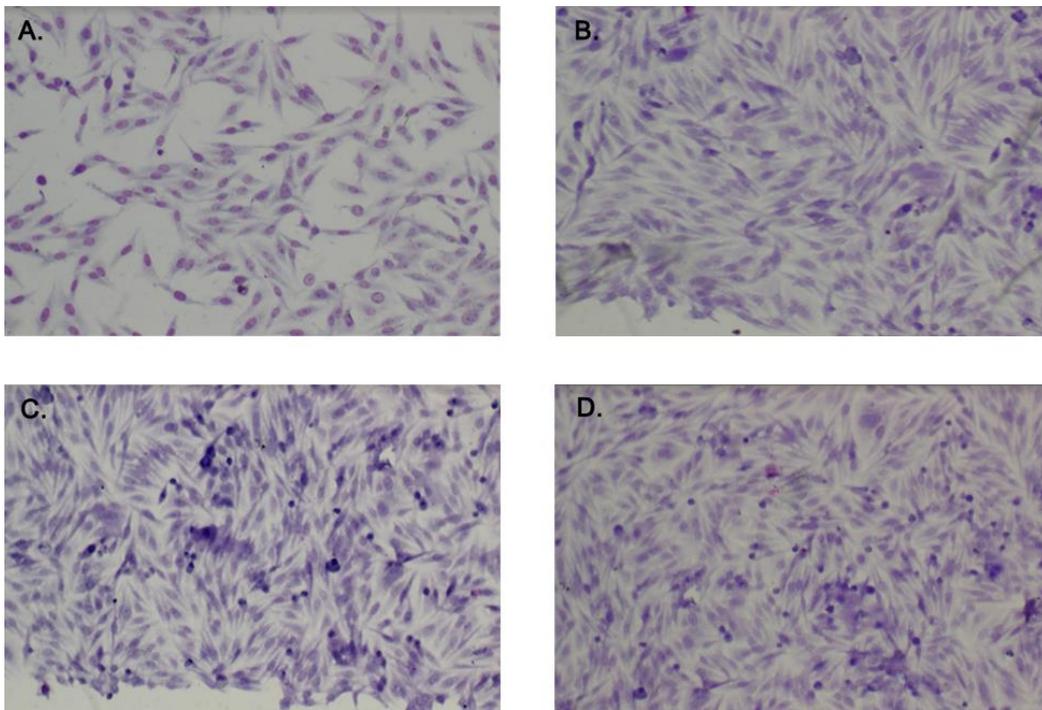


Figura 28. Células HEp-2 infectadas con diversas concentraciones de cuerpos elementales de *C. trachomatis*, observadas al microscopio óptico en objetivo 10X cumplidas las 48 hrs post-infección. **(A).** Control Negativo. **(B).** 10 uL de EB's. **(C).** 20 uL de EB's. **(D).** 40 uL de EB's.

Dado a que *C. trachomatis* es un parásito intracelular obligado que desarrolla su ciclo de vida dentro del citoplasma, multiplicándose como cuerpo reticulado y

liberándose para infectar nuevas células como cuerpo elemental, se observó en la coloración de Giemsa células vacuoladas y células en donde los EB's se encontraban aproximados al citoplasma demostrando que estas células han sido infectadas. Tras realizar la infección se logró identificar las diferentes fases del ciclo:

1. **A las 0 horas:** Donde las células no se encuentran infectadas (control negativo). Se observó la morfología celular en perfectas condiciones, células con citoplasma completo, de color grisáceo, núcleos y nucléolos definidos púrpuras, células adheridas en monocapa y sin cuerpos extraños para resaltar (Figura 29).

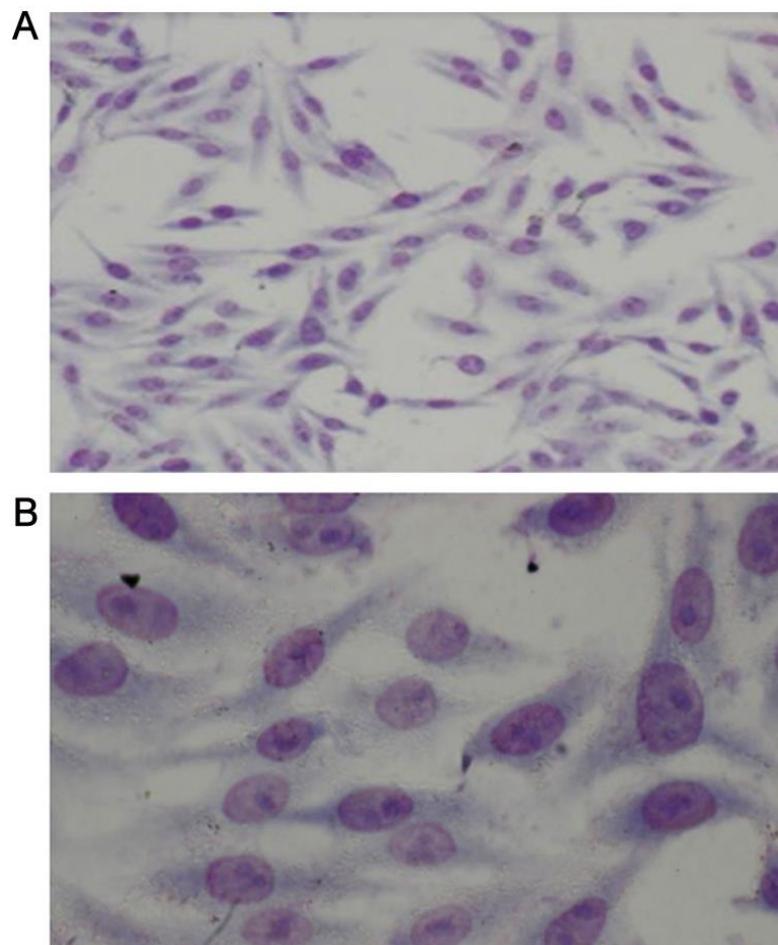


Figura 29. (A) Pozo de células HEp-2 (control negativo) observado en objetivo de 10X a las 24 horas de cultivo antes de iniciar la infección, a una concentración celular de 50.000/cél

alcanzando 90% de confluencia. **(B)** Células HEP-2 (control negativo) observado en objetivo de 40X.

2. **A las 24 horas post- infección** (Pozo 2, 3 y 4): Los cuerpos elementales ya han infectado las células y una vez entran a las mismas, empiezan a reorganizarse de EB's a RB's para replicarse por fisión binaria hasta el punto de lisis la célula, evidenciando cuerpos *Chlamydiales* intracelularmente. (Figura 30A-B)

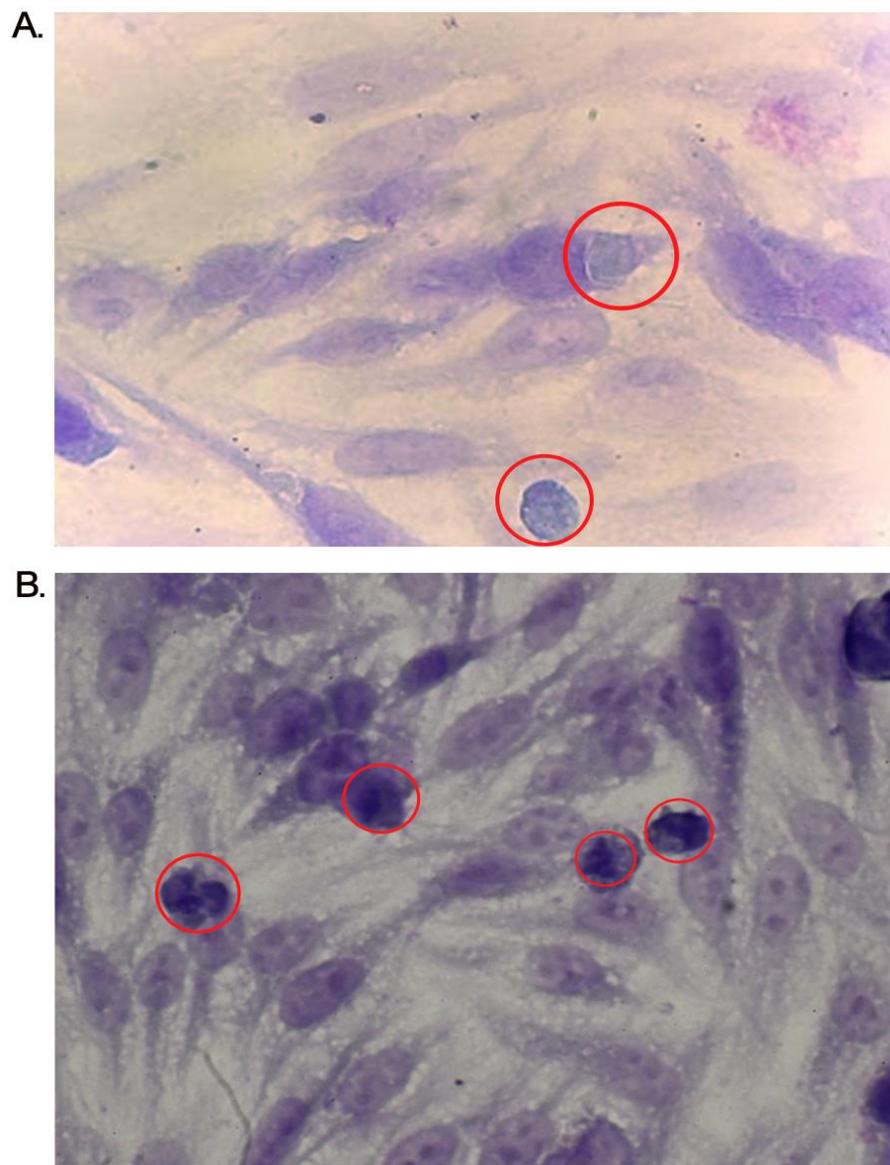


Figura 30. Células HEp-2 teñidas con Giemsa infectadas con cuerpos elementales de *C. trachomatis* a las 24 h.p.i., coloreadas con Giemsa. **(A)**. Se visualiza una forma de inclusión intracelular señalizada con una circunferencia roja en la parte central, y un cuerpo elemental en el parte inferior igualmente señalizado, en objetivo de 100X **(B)**. Cuerpos de *C. trachomatis* observados intracelularmente (Zona izquierda) y próximos al citoplasma de las células (Zona derecha), en objetivo de 40X.

3. **A las 48 horas post infección**, (Pozos 5, 6 y 7): Los RB's ya se han reorganizado a EB's generando la lisis celular, liberándose para infectar nuevas células y continuar con el ciclo (Figura 31A-B). Por otro lado, al completarse el ciclo de vida, las células se observan con daño celular debido al daño generado por el cuerpo elemental de *C. trachomatis* (Figura 31C-D).

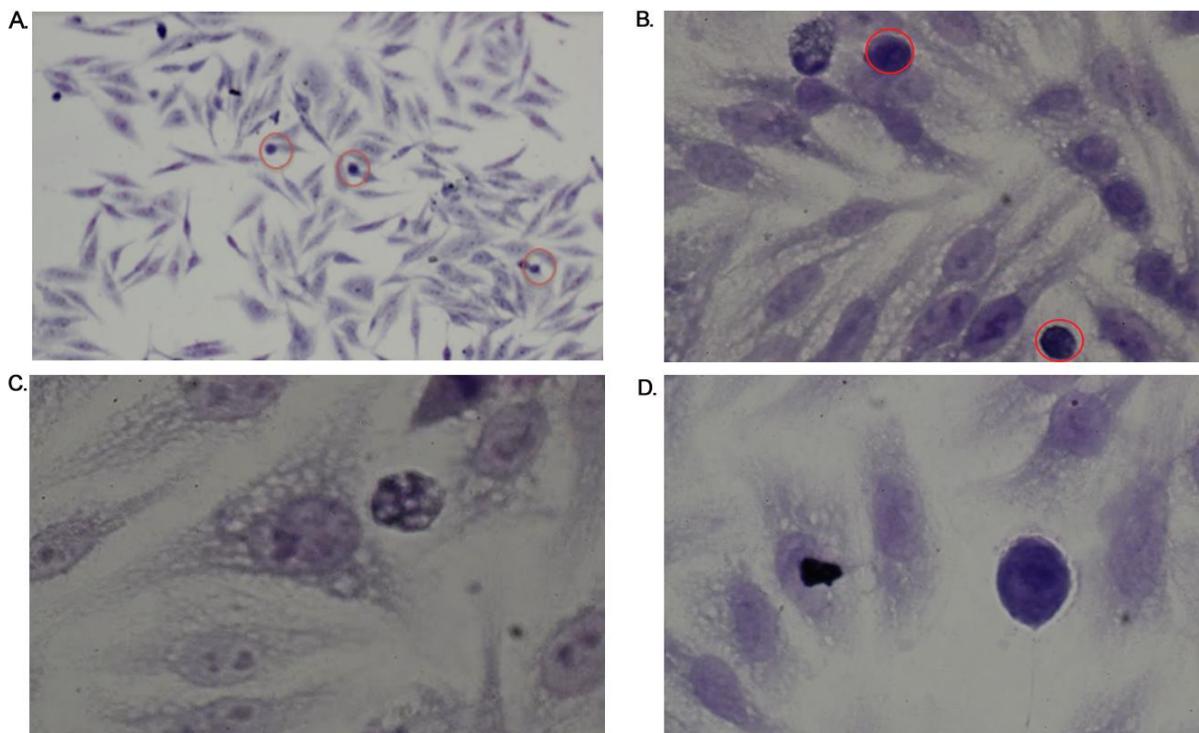


Figura 31. Células HEp-2 a las 48 h.p.i. teñidas con Giemsa y visualizadas en diferentes objetivos al microscopio óptico. **(A)** Células vistas en objetivo de 10x, que presentan cuerpos elementales demarcados por la señalización roja próximos a citoplasmas celulares. **(B)** Cuerpos elementales observados en 40x. **(C)** HEp-2 observadas en objetivo de 100x vacuoladas. **(D)**. Células apoptóticas.

Tras visualizar la totalidad de las láminas de infección en células HEp-2 teñidas con Giemsa, se pudo observar diferentes campos *microscópicos* en donde destacaba la presencia de cuerpos elementales cercanos a las células, asociándose al desarrollo del ciclo de vida de *C. trachomatis* (Figura 32).

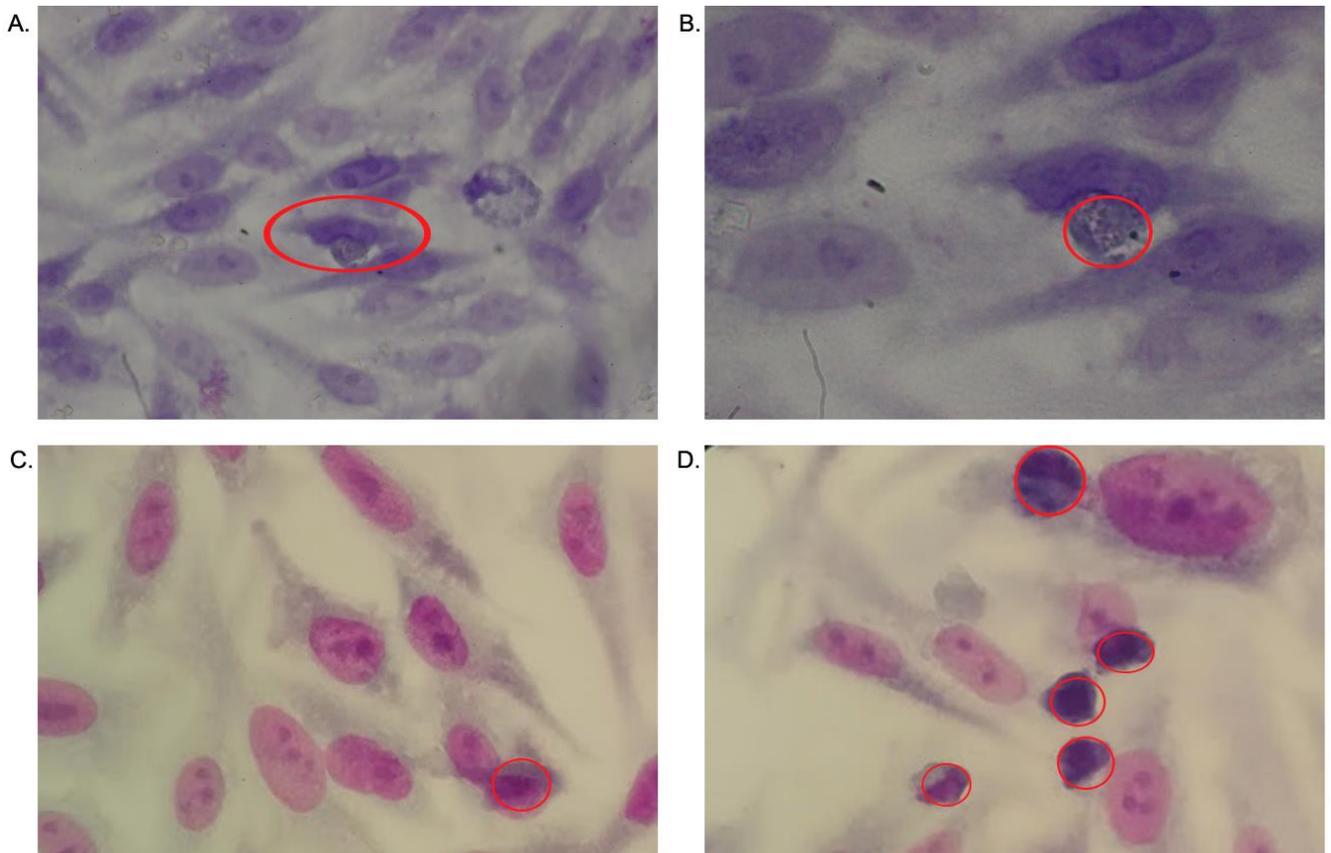


Figura 32. Células HEp-2 teñidas con Giemsa infectadas con cuerpos elementales de *C. trachomatis* y vistas al microscopio óptico. **(A)**. En objetivo de 40X, se observa una célula siendo infectada con un cuerpo elemental ingresando a la misma a las 48 h.p.i. **(B)**. Campo observado anteriormente en objetivo de 100X. **(C)**. Cuerpo de inclusión próximo a citoplasma celular visto en objetivo de 40X. **(D)**. Cuerpos elementales cercanos a las células infectadas con *C. trachomatis*.

Con el ensayo de infección, se obtuvo una infectividad cuerpo elemental – célula, al agregar un volumen de **40 uL** de EB's del serovar LV2 de *C. trachomatis*,

a las 24 y 48 horas post infección, estableciendo así el modelo de infección. La infección se observó inicialmente a partir de la coloración de Giemsa y se confirmó a través de la técnica de Inmunofluorescencia.

5.3.3 Inmunofluorescencia directa

Para confirmar la infección se realizó una inmunofluorescencia directa sobre células HEp-2 cultivadas con medio DMEM con SFB al 20% en láminas MilliCell EZ e infectadas con las diferentes concentraciones de EB's (10uL, 20uL, 40uL) a las 24 y 48 horas post-infección. Se empleó el anticuerpo anti-*Chlamydial ab21211* dirigido contra la proteína de membrana MOMP.

La inmunofluorescencia permitió visualizar los Ebs de *C. trachomatis* en células infectadas. Los pozos de control negativo con células HEp-2 no infectadas demostraron ausencia de fluorescencia, observándose únicamente citoplasmas celulares y núcleos teñidos de azul (Figura 33A-B).

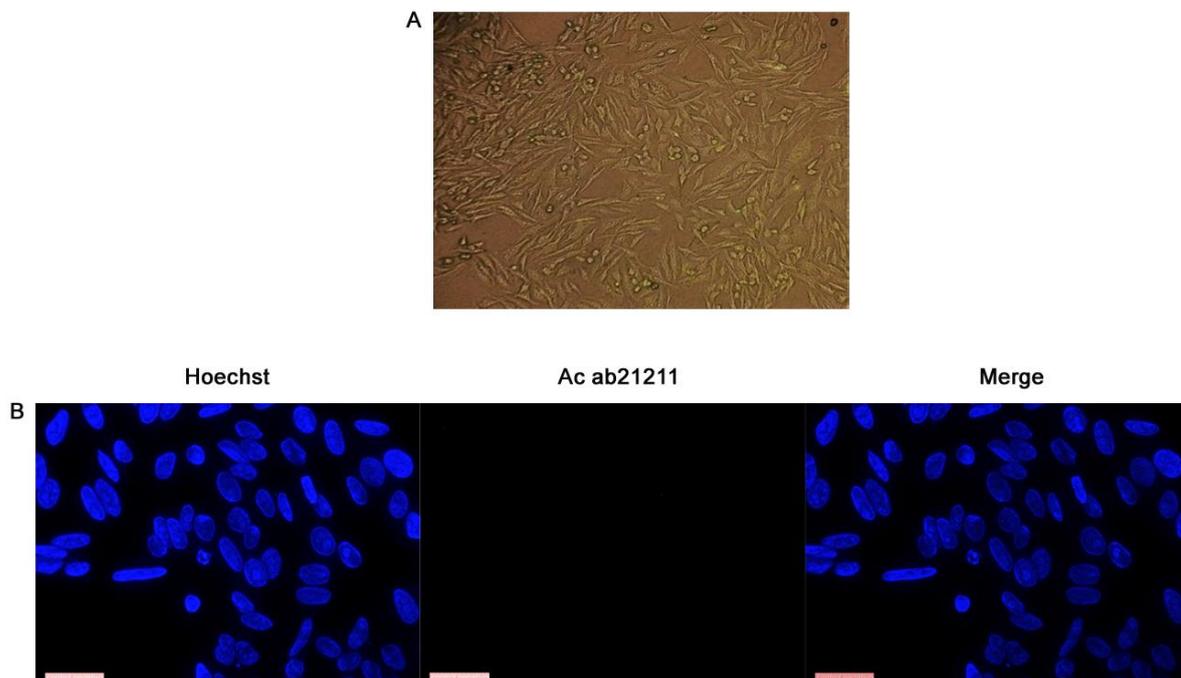


Figura 33. Control Negativo, células HEp-2 no infectadas con EB's de *C. trachomatis* no demuestran fluorescencia. **(A).** Objetivo de 10x, células confluentes sin fluorescencia emitida. **(B).** Se observan núcleos teñidos de azul con Hoechst y la ausencia de fluorescencia por parte del Anticuerpo ab21211 en las células.

Por otro lado, para las células infectadas, se distinguen estructuras verde fluorescentes sobre citoplasmas celulares y cercanos al núcleo (Figura 34).



Figura 34. Células HEp-2 infectadas con EB's de *C. trachomatis* observadas al microscopio de fluorescencia en objetivo de 10x, donde las flechas señalan claramente la presencia de *C. trachomatis* (fluorescencia verde) dentro de los citoplasmas celulares, demostrando su infección.

Al observar las células infectadas a través del microscopio de fluorescencia y marcadas con anticuerpo que emite fluorescencia verde, se visualizan los cuerpos elementales sobre el citoplasma y en otros casos próximos a los núcleos celulares observados de color azul, confirmando la presencia de *C. trachomatis* intracelularmente (Figura 35A-B) destacando en la Figura 35B, un aumento moderado de EB's sobre las células a las 72 horas post-infección, evidenciando la reproducibilidad de los cuerpos elementales con el paso del tiempo de infección.

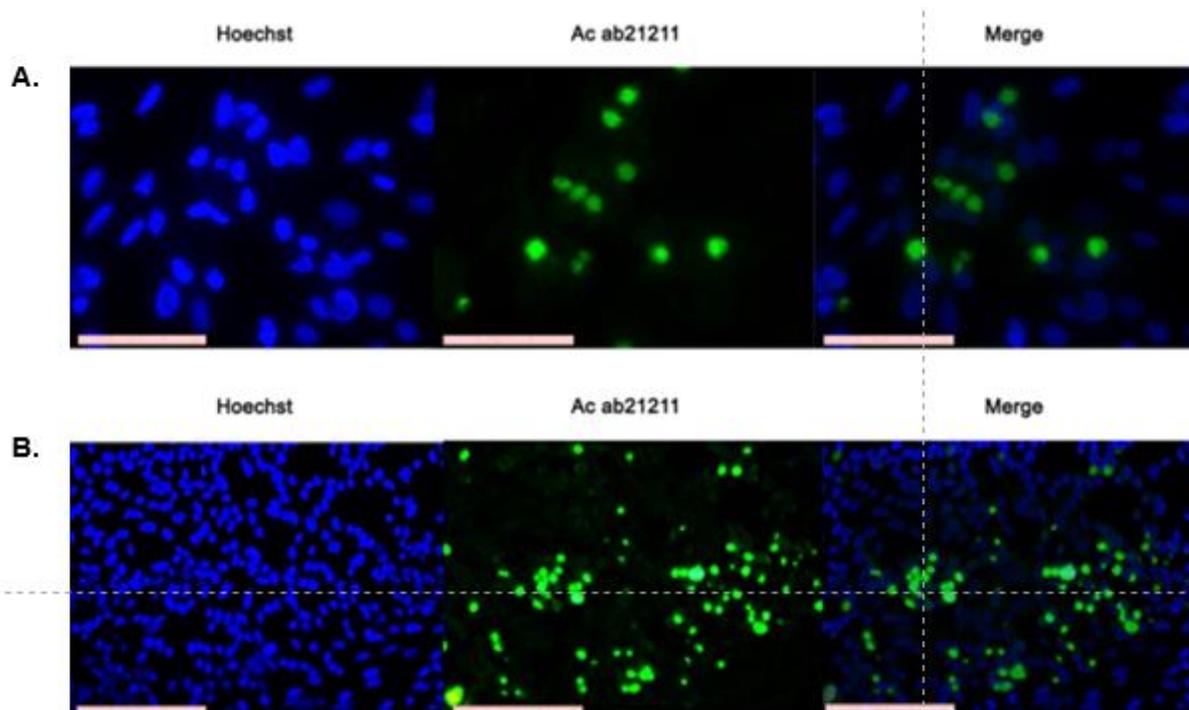


Figura 35. Células HEp-2 infectadas con EB's de *C. trachomatis*, en las cuales se visualizan núcleos celulares teñidos con Hoechst y estructuras verde fluorescente pertenecientes a *C. trachomatis* marcada con anticuerpo ab21211. Fluorescencia emitida a las 72 horas post-infección **(A)** en objetivo de 20X y **(B)** objetivo de 10X, con 40uL de cuerpos elementales.

Finalmente, para confirmar la infección intracelular de *C. trachomatis* en células HEp-2 se observó en dos filtros diferentes (I3 y A). En la Figura 36A se capturo la imagen sin filtros, con luz blanca, donde se pueden ver células confluentes con formas de gran tamaño sobre y próximas a las mismas, posteriormente se realizó *Merge* de las células sin filtro y con el filtro A donde se observaba la fluorescencia dada por el fluorocromo del anticuerpo dirigido a *C. trachomatis* (Figura 36B) confirmando que las formas de gran tamaño vistas desde la luz blanca son los cuerpos elementales de *C. trachomatis*.

De igual modo se capturo las imágenes del mismo campo en el filtro I3 donde

fluorescen claramente los núcleos de las células HEp-2 de color azul (Figura 37C- Hoeschst), luego al pasar al filtro A se observa la fluorescencia de color verde (Figura 37C- Ac ab 21211) y para corroborar esta información se sobrepuso las dos imágenes determinado así que efectivamente la infección se efectuó sobre las células HEp-2. (Figura 37C- Merge).

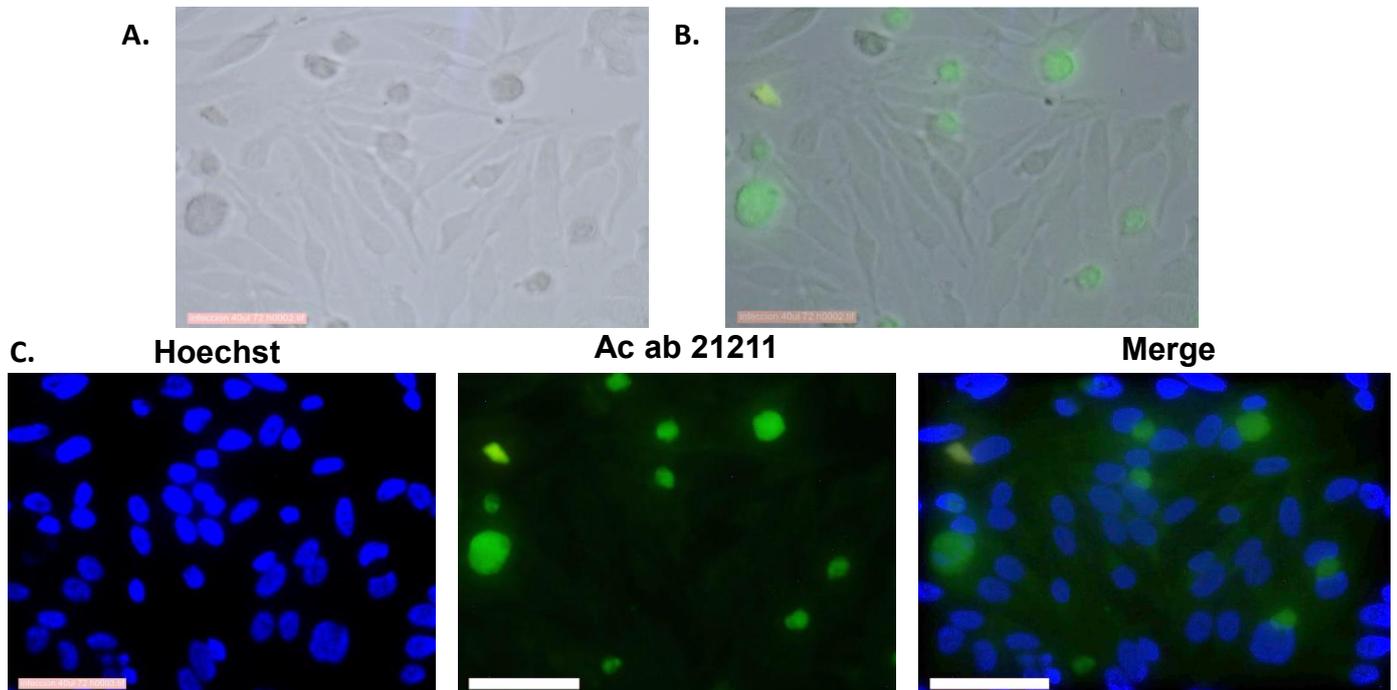


Figura 36. (A). Células HEp-2 infectadas con EB's de *C. trachomatis*, visualizada sin filtros, con luz blanca. **(B).** Merge entre la imagen A y la imagen de C- Ac ab 21211 donde se verifica que las formas observadas en la imagen A diferentes a las células son cuerpos de *C.trachomatis*. **(C).** Hoeschst: Células HEp-2 visualizadas con el filtro I3 donde se observan núcleos celulares teñidos con Hoeschst Ac ab 21211: Estructuras verdes fluorescentes pertenecientes a *C. trachomatis* marcada con anticuerpo ab21211. Merge: Solapamiento entre las dos imágenes anteriormente descritas donde se corrobora la infección celular con cuerpos elementales.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se estableció el modelo de infección en células HEp-2 con cuerpos elementales de *C. serovar L2* siguiendo con la línea institucional del grupo de Biotecnología y Genética UCMC, siendo útil para ser aplicado en distintas áreas del conocimiento.

Con el fin de establecer el protocolo de infección de la cepa de *C. trachomatis* serovar L2, (bacteria intracelular obligada y de ciclo de vida que se da de forma parasitaria), se instauró el cultivo de la línea celular HEp-2 de manera óptima, cultivándola en medio DMEM modificando el porcentaje de SFB al 20% y agregando Gentamicina a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% aire para obtener una confluencia del 90% a las 24 horas.

En el estudio realizado por *Pajaniradje et al* (42), reportaron que las células HEp-2 se pueden mantener en medio DMEM suplementado con 10% SFB, a 37°C en una incubadora humificada con una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de O₂, así como se realizó en el establecimiento de la línea celular en este estudio.

Por otro lado, según lo establecido por *Juntinico et al* (38), donde estandarizaron el cultivo de las células HEp-2, determinaron las condiciones de siembra para su crecimiento, destacando el uso de medio MEM Gibco® y DMEM:F12 variando la concentración de SFB entre 5% y 10%, además de la presencia o ausencia de glutamina al 1% y/o antibiótico al 1% sometido a una temperatura constante de 37°C y 5% de CO₂, sin embargo en este estudio el establecimiento del cultivo de la línea HEp-2 se llevó a cabo únicamente con el uso

de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y 20%, sin la adición de glutamina ni antibiótico obteniendo los resultados esperados en cuanto a confluencia y viabilidad celular en un tiempo determinado, comprobándose que a pesar que los requerimientos nutricionales usados en dicho estudio fueron modificados las células tenían una confluencia del 90% ideales para realizar la infección. Los requerimientos nutricionales son de importancia para establecer el cultivo celular y generar un crecimiento rápido como se observó en los ensayos realizados.

La concentración celular usada en la placa de 6 pozos en donde se valoró la coloración con Giemsa puede compararse con estudios como el de *Noboru Nakasone et al* (43), donde se calculó como densidad celular de HEP-2 para evaluar la adhesión de bacterias entero-patógenas y detección de la proteína *EspBa* 2×10^5 por pozo, estas células fueron cultivadas en DMEM y suplementadas con 10% de suero bovino fetal a 37 °C en 5% de CO₂ observando una monocapa con 60% de confluencia a las 18 horas de cultivo, así como se evidenció en el ensayo donde se usó la placa de 6 pozos y se empleó una densidad celular de $2,5 \times 10^5$, cultivadas con medio DMEM y suplementadas con SFB al 10% a 37 °C en 5% de CO₂, con una monocapa del 80% a las 48 horas. Demostrándose así que a mayor tiempo de incubación mayor confluencia.

La infección celular con EB's de *C. trachomatis*, es un proceso importante en donde existen variables que pueden afectar el ensayo, como la adición de cuerpos elementales en una concentración inadecuada puesto que como se sabe las inclusiones de *C. trachomatis* pueden fusionarse si dos bacterias infectan una sola célula huésped por lo que es importante mantener una infectividad cuerpo elemental-célula; el uso de antibiótico para cultivos, en este caso la Gentamicina,

es la indicada y empleada en estudios como el de *Osaka I., Scott P. (44), Nans A. et al (45). Cunha M. Et al (46) y Derrick T. (47)*, también está el uso de soluciones tales como SPG y HBSS con pH que afecten el monocapa celular, entre otras. Aquí, la unión células-EB's y la invasión a estas, son clave para el desarrollo de *C. trachomatis* y su patogenia, puesto que al presentarse una interrupción puede llegar a ser inhibida la infección, resaltando la importancia de un cultivo de células confluyente y una infectividad EB's - célula adecuada.

Como se describió anteriormente una de las variables que puede alterar el desarrollo de la línea celular para generar el modelo de infección, es el uso de antibióticos por lo que es fundamental resaltar lo descrito en artículos donde se desarrollan modelos de infección y lo descrito en el "Current Protocols in Microbiology" de *Richard Coic* en la revista Wiley InterScience (48); donde hacen mención del uso de Gentamicina y no es posible usar antibióticos debido a que, al trabajar con *Chlamydia*, antibióticos como la penicilina y la estreptomina comúnmente utilizados para inhibir la contaminación bacteriana en células de cultivo de tejidos no se pueden utilizar puesto que inhibirían el desarrollo de este microorganismo. A su vez, es preciso destacar que la Gentamicina se utiliza rutinariamente para inhibir el crecimiento bacteriano extracelular y *Chlamydia* al replicarse dentro de una vacuola única donde no se fusiona con organelos endocíticos o lisosómicos, no se encuentra expuesta a daño celular por dicho antibiótico. Por lo tanto, el medio de cultivo suplementado con Gentamicina puede usarse sin ningún inconveniente, considerando que la Gentamicina no puede cruzar las membranas de mamíferos y no entra en contacto con el cuerpo reticulado, y aunque pueda internalizarse en las células de los mamíferos por pinocitosis, las

vesículas pinocitóticas tampoco se fusionan con las vacuolas que contienen a *Chlamydia*.

En estudios donde se realizó un proceso de infección, se muestra el uso del SPG para la dilución de cuerpos elementales y como medio de transporte para *C. trachomatis*, y el HBSS para lavados de las monocapas, como lo descrito en el trabajo de *Engström P. et al* (49), *Vicetti R.* (50), *Ibana JA et al* (36), donde se emplean una o ambas soluciones durante el proceso de infección y para el mantenimiento de los EB's, igual a lo realizado en el protocolo de infección en este estudio; no obstante, en otras investigaciones se omite el uso de estas soluciones y los protocolos de infección son modificados en algunos procesos como centrifugación asistida para favorecer la infección según lo descrito por *Nans A. et al* (45). Así mismo, en lo mencionado por *Becker E. y Hegemann J.* (51), al añadir los cuerpos elementales estos se incubaron a 37°C sin centrifugación para evitar algún efecto sobre el proceso infección-adhesión celular, sin embargo, *Al-Zeer MA. et al* (52), de acuerdo a la especie de *Chlamydia* describe el uso o no centrifugación como requerimiento para la infección; en este caso, no influyó el realizar un proceso de centrifugación y optar por un proceso de incubación de EB's con células HEp-2 a temperatura de 37°C , según se pudo comprobar al realizar la tinción de Giemsa a las monocapas de células HEp-2 infectadas con el microorganismo en cuestión, pues no es un proceso que determina el resultado de los ensayos.

La detección de *C. trachomatis* por Giemsa se ha utilizado para observar la presencia de inclusiones citoplasmáticas de líneas celulares infectadas con esta bacteria en el trabajo de *Giakoumelou S. et al* (40), donde células estromales del endometrio fueron infectadas con *C. trachomatis*; los signos de infección se revelaron a partir de inclusiones teñidas de color púrpura mediante la tinción de

Giemsa, lo cual se asemeja a este ensayo, dado que los cuerpos elementales son observados de esta tonalidad, próximos a las células HEp-2. Las células teñidas con Giemsa, tal como lo muestra el estudio realizado por Soysa *P et al* (53), tras ser infectadas exhibieron cambios característicos en la morfología celular que indican la muerte apoptótica y daño en células HEp-2 al observarse por microscopía óptica después de ser tratadas con el extracto de la planta semecarpus donde se añadió un volumen de Giemsa diluido (1: 9, pH 7,2, 5 μ L) a las células durante 10 minutos. Lo que difiere para este caso ya que tras probar las variables se determinó un tiempo de exposición de 60 min añadiéndose un volumen de Giemsa (30:1, pH 7,2, 300 μ L). Comprobándose que Giemsa es una herramienta útil para poder observar las estructuras celulares y evaluar la infección con *C. trachomatis*.

Cabe aclarar que la infección celular se valoró en un intervalo de tiempo de 24 horas y 48 horas teniendo en cuenta su ciclo de vida; el cuerpo elemental es la forma infecciosa de *C. trachomatis*, resaltando que tras realizar los ensayos se demostró que dentro del medio celular los EB's son ambientalmente estables, sin embargo, luego del ensayo de viabilidad celular en cámara de Neubauer se comprobó que los EB's son lábiles; en el ciclo de vida el EB se une y entra en la célula formando una inclusión, entre las 9-12 h después de la infección (h.p.i), los RB se dividen repetidamente y al no ser infectantes ocurre una conversión de RB a EB que usualmente es detectada aproximadamente a las 24 h.p.i y finalizando en la liberación de los EB's listos para infectar nuevas células entre las 40-48 h.p.i (54), por lo que principalmente, durante estos períodos de tiempo se buscó encontrar inclusiones y la forma infecciosa de *C. trachomatis* al revelarla por medio de la tinción de Giemsa e Inmunofluoresencia.

La técnica de inmunofluorescencia permitió confirmar la presencia de *C. trachomatis* en células HEp-2, los resultados obtenidos se pueden comparar con la tinción de Giemsa en cuanto al tamaño de la partícula infecciosa. Estudios como el de Armitage CW et al (55), donde evaluaron la infección en células HEC1-A con el serovar L2 (VR-902B) de *C. trachomatis* y lo demostraron con inmunofluorescencia, los cuerpos de inclusión se observan de gran tamaño (análogo al núcleo celular) siendo similar a lo encontrado en este proyecto, así como en el trabajo de Nogueira AT et al (35), en células HaCaT con *C. trachomatis serovar L2*, donde las inclusiones de *Chlamydia* parecían maduras.

Tras llevar a cabo el establecimiento del protocolo de infección se logró avanzar con la línea institucional del grupo de Biotecnología y Genética UCMC ya que, *Carrera et al* (55), realizaron la estandarización de la línea celular HeLa y HEp-2 en miras de generar la infección y por otro lado el trabajo de *Juntinico et al* (38), donde diseñaron un estudio de doblaje poblacional, demostrando obtener un mejor crecimiento de la línea celular HeLa ya que consigue la confluencia necesaria en un rango de tiempo menor que las HEp-2 y con menores exigencias respecto a medio y concentración de L- glutamina. Por tales motivos, este estudio es de gran importancia dado a que al generar un modelo de infección es el camino para abrir nuevos campos de investigación.

El establecer un modelo de infección de *C. trachomatis* abre las puertas a realizar nuevos ensayos en diferentes áreas de la investigación para contribuir al conocimiento científico, aplicándolo en estudios (Figura 37), como la reducción de tamaño de los RB's al dividirse antes de su conversión a EB's (54), regulación de la extrusión como mecanismo de liberación de *C. trachomatis* (57, 58).

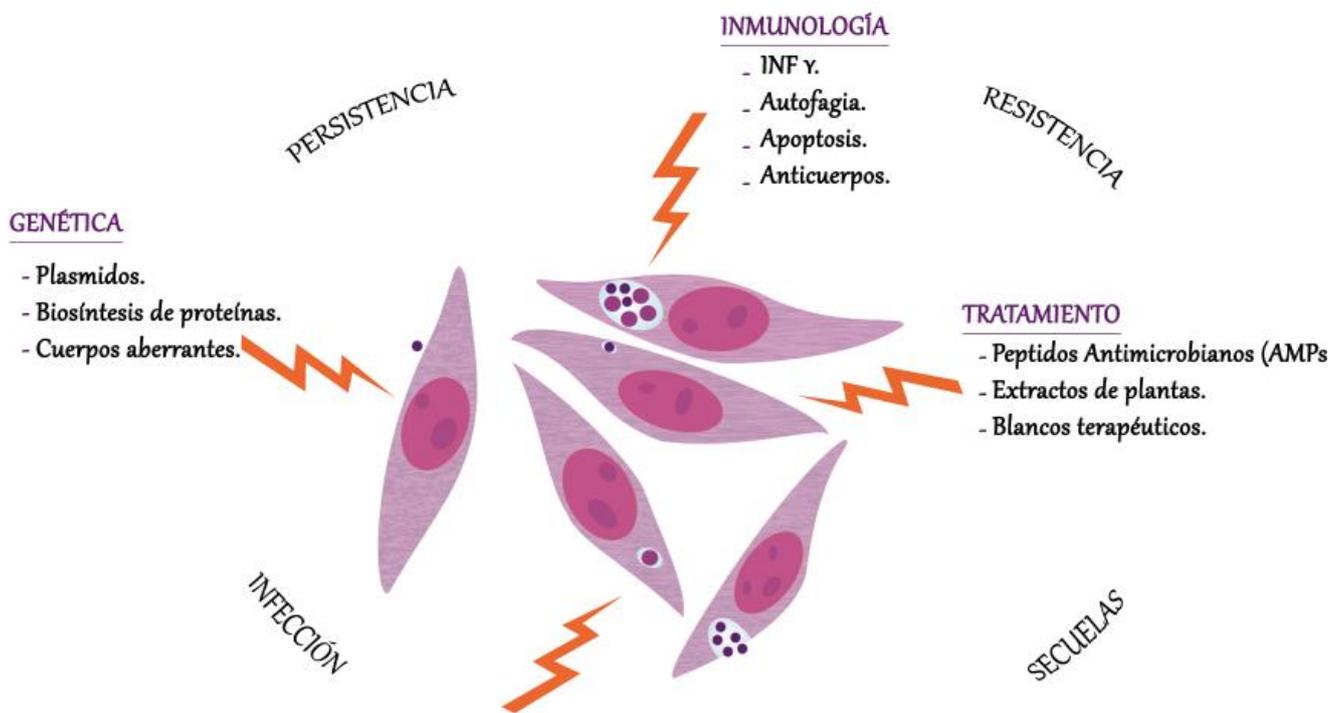


Figura 37. Aplicaciones de *C. trachomatis* en áreas del conocimiento como genética, inmunología y terapia.

7. CONCLUSIONES

1. Para instaurar un cultivo celular de la línea HEp-2 y realizar la infección con *C. trachomatis* serovar L2, es necesario mantener las células en una atmósfera 37°C con 5% de CO₂, en medio DMEM suplementado con SFB al 20% y la adición de Gentamicina.

2. Para el protocolo de infección se determinó que la concentración celular adecuada es de 50,000 células por pozo con 90% de confluencia y con un volumen de 40 uL de EB's para obtener una infectividad cuerpo elemental- célula.

3. Dentro de las aplicaciones donde puede ser utilizado este modelo, se encuentran ramas como la genética para realizar estudios con la extracción de ADN, inmunología para evaluar vías de señalización, tratamiento con extractos de plantas, péptidos antimicrobianos, entre otros varios estudios.

4. Es importante establecer un modelo de infección con *C. trachomatis* dado a que permite realizar estudios básicos, avanzando en conocimientos acerca de este microorganismo que afecta a la población sin distinción de género, sexualmente activa, relacionándose con enfermedades de importancia y secuelas dada su persistencia en el organismo.

8. REFERENCIAS

1. Martínez TM. Diagnóstico microbiológico de *Chlamydia trachomatis*: Estado actual de un problema. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2001 [citado 2018 Abr 19]; 18(4): 275-284. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182001000400006>.
2. Shemer Y, Sarov I. Inhibition of growth of *Chlamydia trachomatis* by human gamma interferon: American Society for Microbiology. Journal Article [Internet]. May 1985 [Citado 2017 Ago 09]; 48(2): 592 – 596 Disponible en: <http://iai.asm.org/content/48/2/592.abstract>
3. Hervé C., Whittum-Hudson J.A., H. Ralph Schumacher, Alan P. Differential expression of three *Chlamydia trachomatis* hsp60-encoding genes in active vs. persistent infections. ELSEIVER, [Internet]. 200. [Citado 2 nov. 2017]; Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S128645790900164>
4. Huston WM, Gloeckl S, de Boer L, Beagley KW, Timms P. Apoptosis is Induced in *Chlamydia trachomatis*-infected HEp-2 Cells by the Addition of a Combination Innate Immune Activation Compounds and the Inhibitor Wedelolactone: American Journal of Reproductive Immunology [Internet]. 2011 [Citado 2018 Feb 27]; 65: 460-465. Disponible en: <https://sci-hub.tw/10.1111/j.1600-0897.2010.00936>.
5. Kubo T, Ishida K, Matsuo J, Nakamura S, Hayashi Y, Sakai H, et al. *Chlamydia trachomatis* serovar L2 infection model using human lymphoid Jurkat cells.

- Microbial Pathogenesis [Internet]. 2012 [Citado 2018 Feb 04]; 53(1): 1-11.
Disponibile en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401012000332?via%3Dihub>
6. Datta B., Njau F., Thalmann J., Haller H. and Wagner A. Differential infection outcome of *Chlamydia trachomatis* in human blood monocytes and monocyte-derived dendritic cells. BMC Microbiology, [Internet]. 2014. [Citado 1 nov. 2017]; 14(1). Disponible en:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4236547/#_ffn_sectitle.
 7. Skipp P., Hughes C., McKenna T., Edwards R., Langridge J., Thomson N. and Clarke I. Quantitative Proteomics of the Infectious and Replicative Forms of *Chlamydia trachomatis*. PLOS ONE, [Internet] (2016); [Citado 2017 Nov 1]; 11(2), p. e0149011. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4752267/?report=reader>.
 8. Weber MM, Lam JL, Dooley AC, Noriega NF, Hansen BT et al. Absence of Specific *Chlamydia trachomatis* Inclusion Membrane Proteins Triggers Premature Inclusion Membrane Lysis and Host Cell Death. Cell Reports [Internet]. 2017 [Citado 2017 Nov 1]; 19(7): 1406-1417. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124717305697#>
 9. Zora Profozic, Bosutska, Zagreb, Croatia, Dr Andrija Stampar, Zagreb, Croatia, Microbiology Department, School of Medicine, University of Zagreb. Molecular mechanisms of *Chlamydia trachomatis* resistance to antimicrobial drugs. Frontiers in Bioscience [Internet] January 1, 2018 [Citado jul 2018]: 23, 656-670. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28930567>

10. G. Ramírez N, Vera A. L. C, Villamil J. Gloria Ramírez N, Víctor J, Vera A, Luis C, Villamil J, Cultivos Celulares, Elemento Fundamental para la Investigación; Universidad Nacional de Colombia Revista Acovez. [Internet]. [Citado march 2018];:(24)1 Disponible en: https://encolombia.com/veterinaria/publi/acovez/ac241/acovez24_cultivos14/
11. Libia H U, Roberto A A, Eugenia C, Laya H O, Procedimiento en virología medica; Editorial de la universidad de costa rica. [Internet]. 2004 [Citado March 2018]: 30-35 Disponible en: <https://books.google.com.co/books?isbn=9977679134>
12. Sarrión C S, Juan B C P, Manuel M C, Biología molecular y citogenética; Ediciones paraninfo. [Internet] 2016 [Citado Ago 2018]: 34-39 Disponible en: <https://books.google.com.co/books?isbn=8428338310>
13. Yeny P C, El ciclo celular y su papel en el desarrollo, crecimiento, restitución y reparación de tejidos. Propuesta de aula para los estudiantes de ciclo tres; Universidad Nacional de Colombia [Internet] 2013 [Citado jul 03] 101-107 Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/39571/1/yennyubelype%C3%B1acruz.2013.pdf>
14. Toolan HW. Transplantable Human Neoplasms Maintained in Cortisonetreated Laboratory Animals: H.S. #1; H.Ep. #1; H.Ep. #2; H.Ep. #3; and H. Emb.Rh. #1. American Association for Cancer Research [Internet]. 1954 [Citado 2018 Ene 21]; 14:660-666. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/14/9/660.full.pdf>

15. Moore AE., Sabachewsky L., and Toolan HW. Culture Characteristics of Four Permanent Lines of Human Cancer Cells. American Association for Cancer Research [Internet]. 1955 [Citado 2018 Feb 27]; 15:598-602. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/14/9/660.full.pdf>
16. Lacroix M. Persistent use of “false” cell lines. International Journal of Cancer [Internet]. 2007 [Citado 2018 Feb 27]; 122 (1): 1-4. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.23233/full>
17. Heneen WK. HeLa cells and their possible contamination of other cell lines: Karyotype studies. Hereditas [Internet]. 1976 [Citado 2018 Feb 27]; 82: 217-248 .Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1976.tb01560.x/pdf>
18. Javier C, Carlos N A, Anticuerpos antinucleares. Reumatología clínica: Elsevier Doyma. Article [Internet]. Sep 2009 [Citado 2018 ene 22]; 6(4) :224–230 Disponible en: <http://www.reumatologiaclinica.org/es/anticuerpos-Antinucleares/articulo/S1699258X09002435/>
19. Vasilevsky S, Greub G, Nardelli D, Bauda D. Genital Chlamydia trachomatis: Understanding the Roles of Innate and Adaptive Immunity in Vaccine Research. Clinical Microbiology Reviews [Internet]. April 2014 [Citado 2017 Mar 13]; 27(2): 346 –370. Disponible en: <http://cmr.asm.org/content/27/2/346.full.pdf+html>
20. Ostos OL, Sánchez RM. Chlamydia trachomatis: avances y perspectivas. NOVA [Internet]. 2003 [Citado 2017 Mar 13]; 1 (1); 81 - 93. Disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/artorevi1_1.pdf

21. Jutinico AP, Mantilla A., Sánchez RM. Regulación de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con *Chlamydia trachomatis*. NOVA [Internet] (Citado 2018 Julio 10) 2015; 13 (24): 83-92. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/316654169_Regulacion_de_la_familia_de_proteinas_BCL-2_en_celulas_infectadas_con_Chlamydia_trachomatis
22. Guerra F, Flores S. Factores de riesgo y secuelas reproductivas asociados a la infección por *Chlamydia trachomatis* en mujeres infértiles. Salud Pública Mex [Internet]. 2003 [Citado 2017 Abr 25]; 45 (5): 672-680. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v45s5/v45s5a13.pdf>
23. WHO (World Health Organization). Who Guidelines for the Treatment of *Chlamydia trachomatis* [Internet]. [Citado 2017 Sep 18]. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246165/9789241549714-eng.pdfhttps://www.atcc.org/products/all/CCL-23.aspx?jsessionid=CE25F31A094B032C92D4BC9E6534AD8E?sequence=1#characteristics>
24. O'Connell C, Ferone M. *Chlamydia trachomatis* Genital Infections. Microbial Cell [Internet]. 2016 [Citado 2017 Feb 19]. 3(9): 90-403. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5354567/?report=reader#!po=1.31579>.
25. Cardona JA, Gallego LH, Ríos LA. Infección por *Chlamydia trachomatis* en pacientes de una institución de salud de Bogotá y Medellín, 2012-2015. Revista Chilena Infectol [Internet]. 2016 [Citado 2017 May 9]; 33 (5): 513-518. Disponible

- en: https://www.dinamicaips.com.co/files/investigaciones/2015_investigaciones_dinamica_gallego_lh_chlamydia.pdf.
26. Paavonen J, Eggert-Kruse W. *Chlamydia trachomatis*: Impact on human reproduction. Hum Reprod Update [Internet]. 1999 [Citado 2017 Mar 25]; 5:433-447. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/10582782/>
27. Yasin B, Harwig SS, Lehrer RI, Wagar EA. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to protegrins and defensins. Infection and Immunity [Internet]. 1996 [Citado 2017 Mar 13]; 64(3): 709–713. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC173826/pdf/640709.pdf>.
28. Paredes MC, Gómez YM, Torres AM, Fernández M, Tovar MV. Prevalencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en adolescentes de colegios de la provincia de Sabana Centro, Cundinamarca, Colombia. Biomédica [Internet]. 2015 [Citado 2017 May 9]; 35: 314-24. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v35n3/v35n3a05.pdf>
29. Ministerio de Salud y Protección Social. Situación de las infecciones de transmisión sexual diferentes al VIH. Colombia, 2009-2011. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/observatorio_vih/documentos/monitoreo_evaluacion/1_vigilancia_salud_publica/a_situacion_epidemiologica/SITUACION%20DE%20LAS%20INFECCIONES%20DE%20TRANSMISION_1.pdf
30. Malhotra M, Sood S, Mukherjee A, Muralidhar S, Bala M. Genital *Chlamydia trachomatis*: An update. The Indian Journal of Medical Research [Internet]. 2013 [Citado 2017 Abr 8]; 138(3): 303-316. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3818592/>

31. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial Peptides. Pharmaceuticals [Internet]. 2013 [Citado 2017 Mar 13]; 6(12):1543-1575. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3873676/#_ffn_sectitle
32. Guerra FM, López M, Villagrana R. Nuevas genovariantes del serovar L2 de *Chlamydia trachomatis* causantes de proctitis. Ginecología y Obstetricia de México [Internet]. 2012 [Citado 2017 Oct 25]; 80(3):208-217. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2012/gom123d.pdf>
33. ATCC. THE ESSENTIALS OF LIFE SCIENCE RESEARCH. GLOBALLY DELIVERED™ [Internet]. USA. [Citado 2017 Sep 17]. Disponible en: https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Viruses/Chlamydia_and_Rickettsia/VR-902B.aspx
34. Introducción al cultivo celular [Internet]. [Citado 2017 Abr 8]. Disponible en: https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Viruses/Chlamydia_and_Rickettsia/VR-902B.aspx.
35. Sixt BS, Bastidas RJ, Finethy R, etl. The *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein CpoS counteracts STING-mediated cellular surveillance and suicide programs. Cell Host & Microbe. 2017 [Internet]. [Citado 2018 Julio 20]; 21(1):113-121. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5233594/>
36. Ibane JA, Sherchand SP, Fontanilla FL, Nagamatsu T, Schust DJ et al. *Chlamydia trachomatis*-infected cells and uninfected-bystander cells exhibit diametrically opposed responses to interferon gamma. Scientific Reports. 2018 [Internet]. [Citado 2018 Julio 15]; 8:1-15. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-26765-y>

37. Nogueira AT, Braun KM, Carabeo RA. Characterization of the Growth of *Chlamydia trachomatis* in *In Vitro*-Generated Stratified Epithelium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* . 2017 [Internet]. [Citado 2018 Julio 14]; 7: 1-16. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00438/full>
38. Juntinico AP, Malagon J., Manrique Chacón N, Gómez M, RM Sánchez Mora, Sánchez RM. Cultivo de la línea celular HEp-2: doblaje poblacional y coloración con Giemsa. *Perspectivas para el estudio de la infección con Chlamydia trachomatis* . NOVA [Internet] (Citado 2018 Julio 10) 2015; 13 (24): 83-92. Disponible en <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/233>.
39. Blocker ME, Krysiak RG, Behets F, Cohen MS, Hobbs MM. Quantification of *Chlamydia trachomatis* Elementary Bodies in Urine by Ligase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002 [Internet]. [Citado 2018 Feb 10]; 40(10):3631-3634. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130883/>
40. Giakoumelou S, Wheelhouse N, Brown J, Wade J, Simitsidellis I. Et al. *Chlamydia trachomatis* infection of human endometrial stromal cells induces defective decidualisation and chemokine release. *Scientific Reports*. 2017 [Internet]. [Citado 2018 Feb 12]; 7: 1-9. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-02223-z>
41. ABCAM [Internet]. USA. [Citado 2018 Jun 15]. Disponible en: <https://www.abcam.com/chlamydia-trachomatis-antibody-fitc-ab21211.html>
42. Pajaniradje S, Mohankumar K, Pamidimukkala R, Subramanian S, Rajagopalan R. Antiproliferative and Apoptotic Effects of Sesbania

- grandiflora Leaves in Human Cancer Cells. BioMed Research International. 2014 [Internet]. [Citado 2018 Jul 1]. 2014: 474953. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4053233/#_fn_sectitle
43. Nakasone N, Ogura Y, Higa N, Toma C, Koizumi Y, Takaesu G, Suzuki T, Yamashiro T. Effects of Psidium guajava leaf extract on secretion systems of gram-negative enteropathogenic bacteria. Microbiology and Immunology. 2018 [internet].[Citado 2018 Ago 02].62:7, pp.444-453 Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Noboru+Nakasone++hep-2+espb>
44. Osaka I, Hefty PS. Lipopolysaccharide-Binding Alkylpolyamine DS-96 Inhibits Chlamydia trachomatis Infection by Blocking Attachment and Entry. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014 [internet]. [Citado 2018 Ago 12];58:6.3245-3254.disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4068484/>
45. Nans A, Saibil HR, Hayward RD. Pathogen–host reorganization during *Chlamydia* invasion revealed by cryo-electron tomography. *Cellular Microbiology*. 2014 [Internet]. [Citado 2018 Ago 15];16(10):1457-1472. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4336559/#b45>
46. Da Cunha M, Pais SV, Bugalhão JN, Mota LJ. The Chlamydia trachomatis type III secretion substrates CT142, CT143, and CT144 are secreted into the lumen of the inclusion. Ojcius DM, ed. PLoS ONE. 2017 [internet].[Citado 2018 Jun 29];12:6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5473537/>
47. Derrick T, Last AR, Burr SE. Inverse relationship between microRNA-155 and 184 expression with increasing conjunctival inflammation during ocular

- Chlamydia trachomatis infection. 2016 [Citado 2017 May 13]. Disponible en: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1367-8>.
48. Richard Coic. Current Protocols in Microbiology. Wiley InterScience. 2005. [Libro] [Citado 2017 May 5].
 49. Engström P, Bergström M, Alfaro A, Syam Krishnan K, Bahnan W, Almqvist F, Bergström, S. Expansion of the Chlamydia trachomatis inclusion does not require bacterial replication. International Journal of Medical Microbiology. 2015 [internet]. [Citado 2018 Jul 27]; 305(3):378-382. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422115000181>
 50. Vicetti Miguel RD, Henschel KJ, Dueñas Lopez FC, Quispe Calla NE, Cherpes TL. Fluorescent labeling reliably identifies Chlamydia trachomatis in living human endometrial cells and rapidly and accurately quantifies chlamydial inclusion forming units. Journal of microbiological methods. 2015 [internet]. [Citado 2018 Jul];119:79-82. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4993108/>
 51. Becker E, Hegemann JH. All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function. *Microbiology Open*. 2014 [Internet]. [Citado Ago 2];3(4):544-556. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4287181/> .
 52. Snyder PJ, Bhasin S, Cunningham GR, et al. Effects of Testosterone Treatment in Older Men. *The New England journal of medicine*. 2016 [internet]. [Citado 2018 Agos];374:7.611-624 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4287181/>
 53. Soysa P, Jayarthne P, Ranathunga I. Water extract of *Semecarpus parvifolia* The leaves inhibits cell proliferation and induces apoptosis on HEp-2 cells.

- BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018 [Internet]. [Citado 2018 Ago 01]; 18-1. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29506521>
54. Lee JK et al. Replication dependent size reduction precedes differentiation in *Chlamydia trachomatis*. *Nature COMMUNICATIONS*. 2018 [Internet]. [Citado 2018 Ago 1]; 9(1):45. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-017-02432-0>
55. Armitage CW, O'Meara CP, Beagley KW. *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* Infection Differentially Modulates Human Dendritic Cell Line (MUTZ) Differentiation and Activation. *Scandinavian Journal Immunology*. [Internet]. 2015 [Citado 2018 Ago 15] 48-54. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/sji.12295>
56. Carrera LC et al. Comparación del cultivo celular de HeLa y HEp-2: Perspectivas de estudios con *Chlamydia trachomatis*. *NOVA* [Internet]. 2015 [Citado 2017 May 2]; 12 (21): 17-29. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n23/v13n23a02.pdf>
57. Sherrid AM, Hybiske K. *Chlamydia trachomatis* Cellular Exit Alters Interactions with Host Dendritic Cells. Roy CR, ed. *Infection and Immunity* [Internet]. 2018 [Citado 2018 Ago 4]:285-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5400845/>
58. Nguyen PH, Lutter EI, Hackstadt T. *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane protein MrcA interacts with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (ITPR3) to regulate extrusion formation. *PLOS Pathogens*. 2018 [Internet]. [Citado 2018 Ago 1]; 14(3):e1006911. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5854415/>

ANEXOS

ANEXO 1 - HBSS (HANKS' BALANCED SALT SOLUTION) *

- ✓ 0.40 g KCl (5.4 mM final)
 - ✓ 0.09 g Na₂HPO₄·7H₂O (0.3 mM final)
 - ✓ 0.06 g KH₂PO₄ (0.4 mM final)
 - ✓ 0.35 g NaHCO₃ (4.2 mM final)
 - ✓ 0.14 g CaCl₂ (1.3 mM final)
 - ✓ 0.10 g MgCl₂·6H₂O (0.5 mM final)
 - ✓ 0.10 g MgSO₄·7H₂O (0.6 mM final)
 - ✓ 8.0 g NaCl (137 mM final)
 - ✓ 1.0 g D-glucose (5.6 mM final)
 - ✓ 0.2 g phenol red (0.02%; opcional)
- Agregue H₂O a 1 litro y ajuste el pH a 7.4 con HCl 1 M o NaOH 1 M
- Filtrar, esterilizar y almacenar hasta 1 mes a 4° C
- Las botellas deben mantenerse bien cerradas para evitar la pérdida de CO₂ y la posterior alcalinización

** HBSS puede fabricarse o comprarse sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (CMF-HBSS). Estos componentes son opcionales y generalmente no tienen ningún efecto en un experimento; en algunos casos, sin embargo, su presencia puede ser perjudicial. Consulte los protocolos individuales para ver si la presencia o la ausencia de estos componentes es recomendado.*

ANEXO 2 - SPG: TAMPÓN DE FOSFATO DE SODIO- 0.1 M.

Solución A: 27,6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por litro (0,2 M final) en agua

Solución B: 53.65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro (0.2 M) en agua

- Mezcle los volúmenes indicados de soluciones A y B, luego diluya con agua a 200 ml. Filtre y esterilice si es necesario.
- Almacenar hasta 3 meses a temperatura ambiente.
- Este tampón se puede hacer como un concentrado de 5 o 10 veces al aumentar la cantidad de sodio fosfato en el mismo volumen final. Los tampones de fosfato muestran dependencia de la concentración cambios en el pH, entonces verifique el pH diluyendo una alícuota del concentrado en la concentración.