

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

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BACTERIOLOGA Y LABORATORISTA CLÍNICO





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

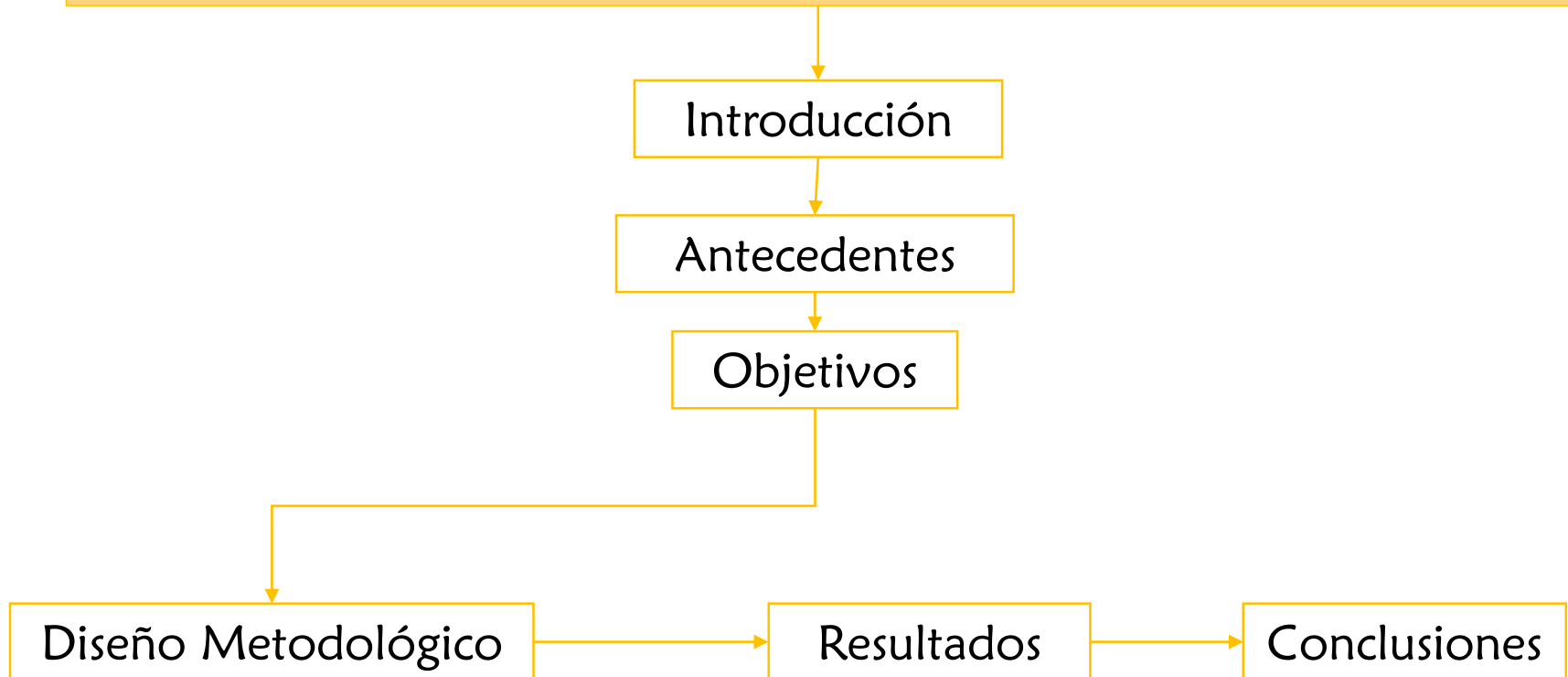
PARA OBTENER EL TÍTULO DE BACTERIOLOGA Y LABORATORISTA CLINICO

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**

CONTENIDO

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

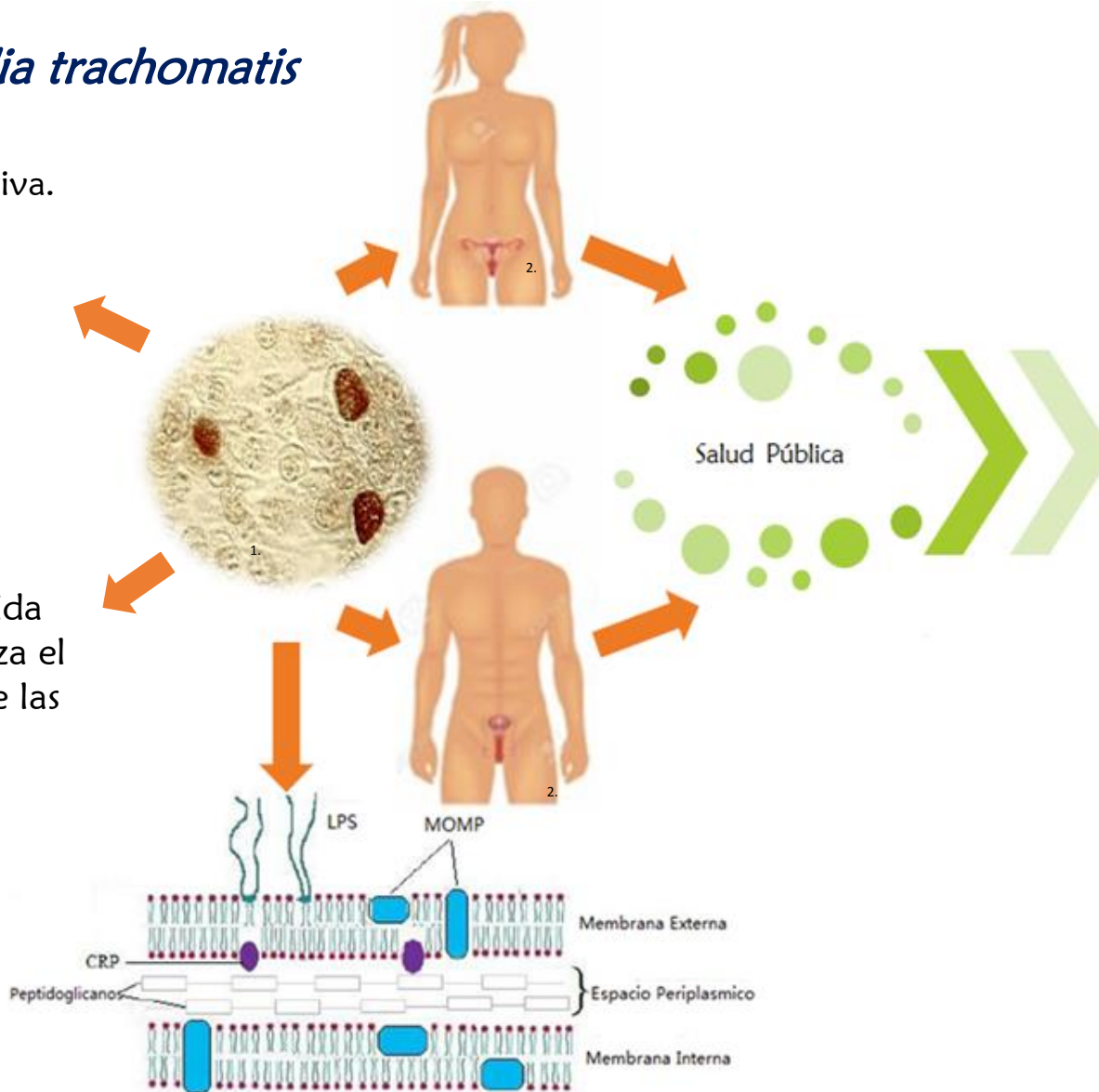


INTRODUCCIÓN

Chlamydia trachomatis

- Gram negativa.
- No móvil.
- De vida parásitaria.
- Parásito energético.

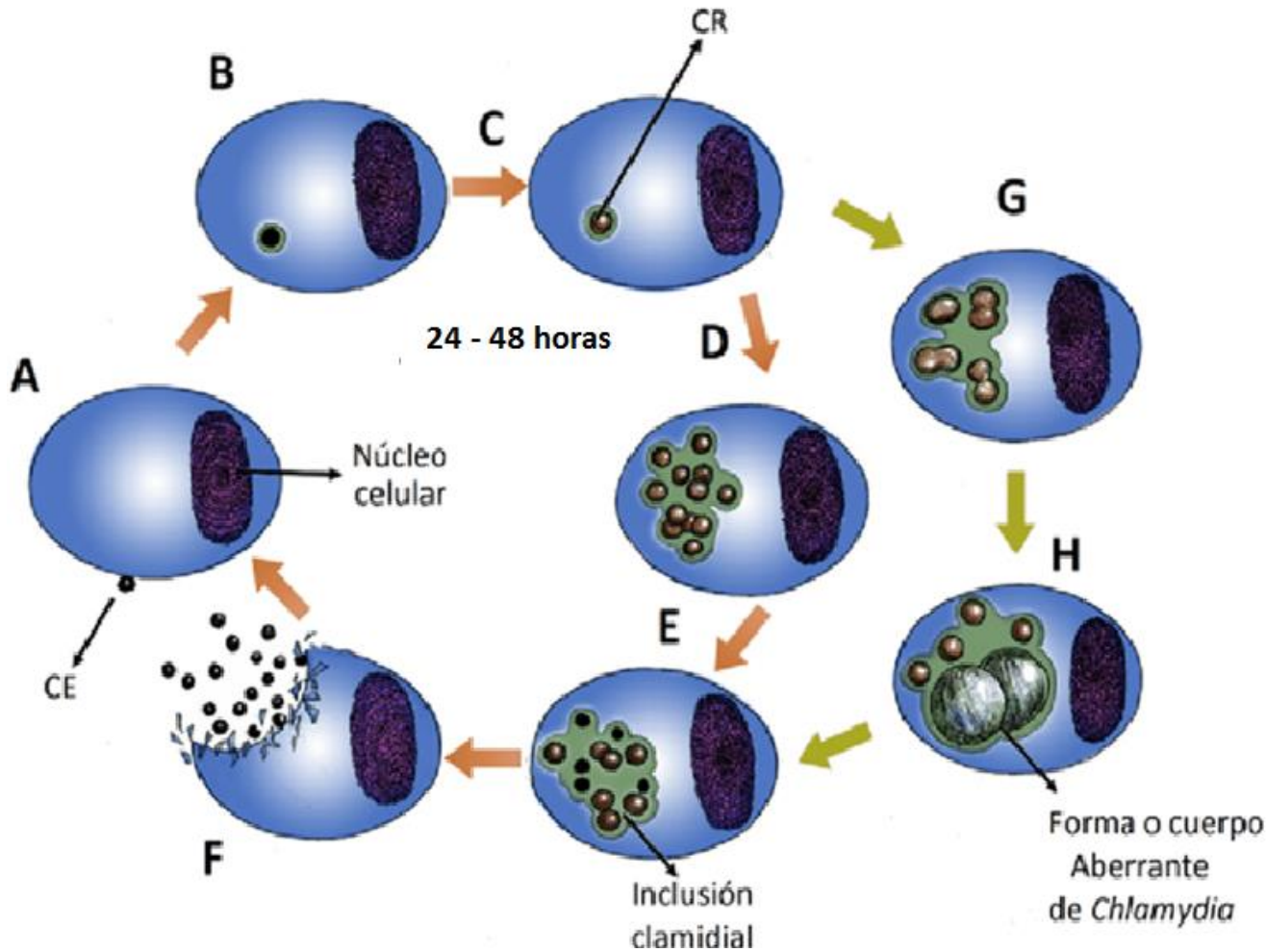
Carece de vida libre y coloniza el citoplasma de las células.



Secuelas



Chlamydia trachomatis



https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Ciclo-de-vida-de-Chlamydia-trachomatis-El-ciclo-de-vida-de-CT-tiene-una_fig1_320821504

Cuerpos elementales (EB's)

Inducen la fagocitosis, no tienen actividad metabólica, no se pueden replicar y son infecciosos.

Al ser fagocitados se diferencian

Cuerpos reticulares (RB's)

Son capaces de replicarse pero no son infecciosos. Tienen actividad metabólica y el ADN está disperso.

Chlamydia trachomatis

Asintomática 50%

Hombres

Mujeres

Asintomática 70%

- Prurito
- Disuria
- Dispareunia
- Secreción vaginal/uretral.

Proctitis

Uretritis

Epididimitis

Infertilidad

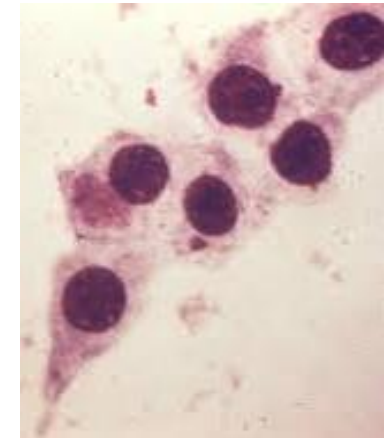
Embarazo ectópico

Endometritis

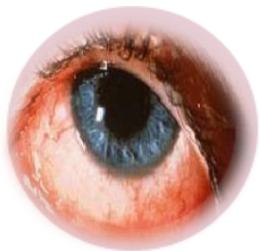
Endocervicitis

COINFECCIÓN

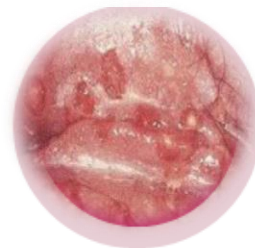
Complicaciones y secuelas



<https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQ9pOj8BxaZSCA87FDTuR5umhREqnNVFYkvQPyB0QwUspLxTRQK>



Tracoma
Serovares A-C



Infecciones del tracto genitourinario.
Serovares D, E, F, G, H, I, J, K, L.

CULTIVO CELULAR

Herramienta básica de aplicación fundamental

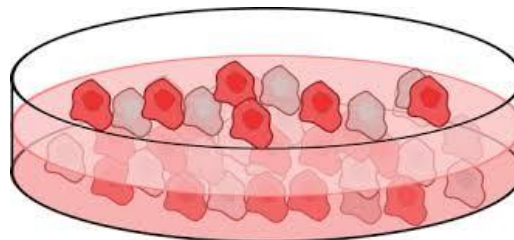
Se establece a partir del primer subcultivo de un cultivo primario.

Permite

Conocer el comportamiento *in vitro* de las células cancerosas y entender un proceso fisiopatológico.



https://st3.depositphotos.com/7622586/17184/i/1600/depositphotos_171841576-stock-photo-scientist-working-with-a-cell.jpg



<http://www.equimed.com.co/img/fotos/banner-cult-linea-celular.jpg>

VENTAJAS

- Control del medio ambiente.
- Caracterización y homogeneidad de la muestra.
- Economía
- Cuestiones éticas.

DESVENTAJAS

- Técnica de estrictas condiciones.
- Inestabilidad.

LINEA CELULAR

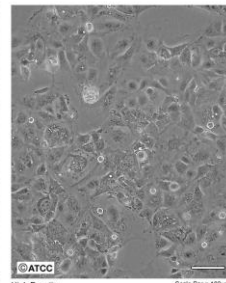
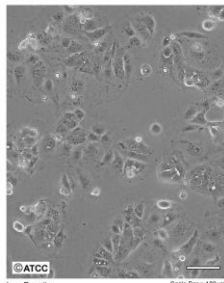
Células de un tipo único (humano, animal o vegetal) que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio y que se usan en investigación.

Instituto Nacional De Cáncer

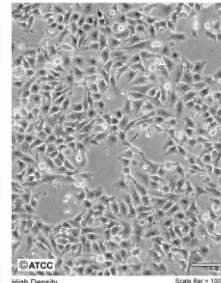
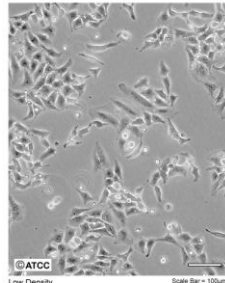
Línea Celular	Origen/Humano	Tipo de Línea	ID ATCC
HEp-2	Tracto respiratorio superior	Cáncer Laríngeo	CCL-23™
A549	Tracto respiratorio inferior	Adenocarcinoma de pulmón	CCL-185™
Caco-2	Tracto Gastrointestinal	Adenocarcinoma Colorectal	HTB-37™
HeLa	Tracto genitourinario	Adenocarcinoma Cervical	CCL-2™
NT2	Neuromuscular	Teratocarcinoma de células neuronales	CRL-1973™
THP-1	Células Inmunes	Monocitos de sangre periférica de leucemia monocítica aguda	TIB-202™
U937	Células Inmunes	Monocitos de linfoma histiocítico	CRL-1973™
H9	Células Inmunes	Linfocitos T derivados del Síndrome de Sezary	HTB-176™
Raji	Células Inmunes	Linfocitos B del linfoma de Burkitts	CCL-86™

Modificado de IWS Li *et al.*, 2009

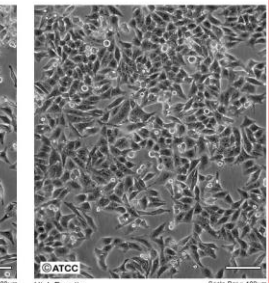
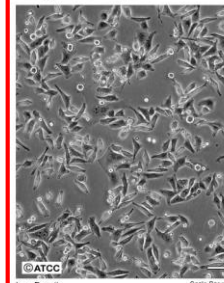
ATCC Number: HTB-37
Designation: Caco-2



ATCC Number: CCL-2
Designation: HeLa

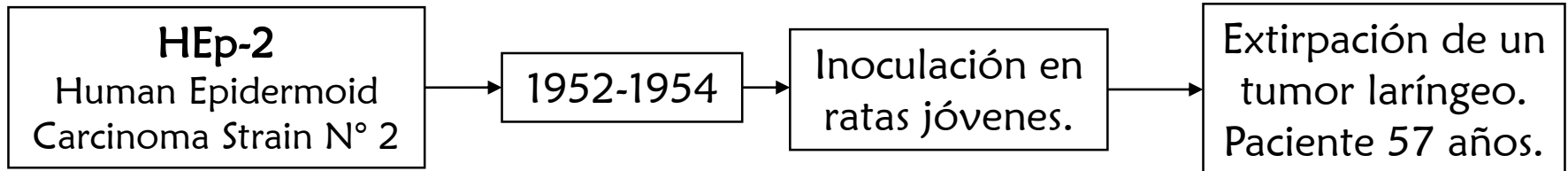


ATCC Number: CCL-23
Designation: HEp-2



LINEA CELULAR HEp-2

ANTECEDENTES



DESCRIPCIÓN

Línea celular
epitelial continua

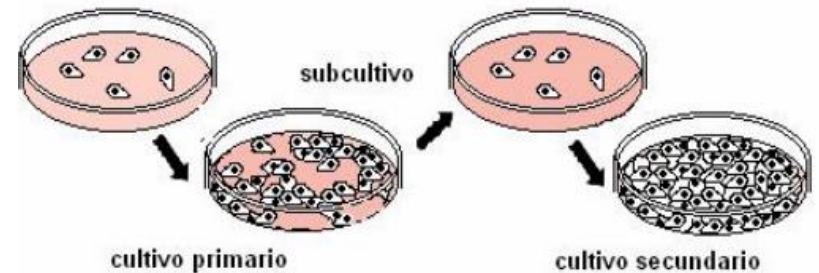
Metabólicamente
activa

Crecimiento en
monocapa

Tipo estacionario

Puede ser sub-cultivada *in vitro* por lo menos 70 veces indefinidamente.

PROCESO



<http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>

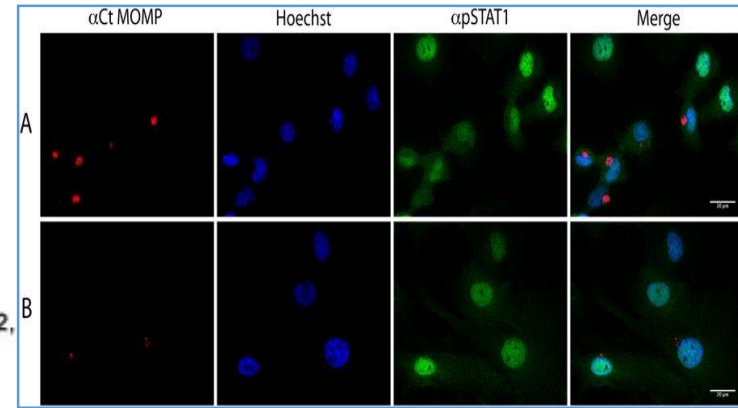
ANTECEDENTES

1985

Tratamiento de células HEP-2 con interferón gamma antes de la infección.
Shemer Y. et al

2016

Estudio sobre el serovar L2, relación de infectividad entre partículas y la secuencia del genoma.
Skip P. et al



Joyce Ibaña et. al

1953

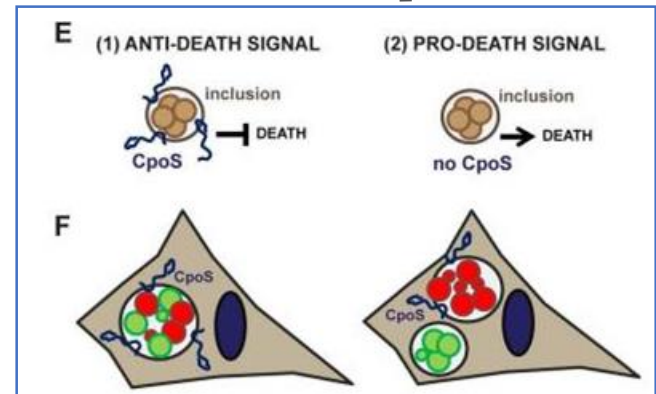
Crecimiento de células HEP-2 en ratas tratadas con cortisona.
Toolan HW.

Expresión de genes (Ct110, Ct604, Ct755) que codifican para la proteína de *C. trachomatis* HSP60.
Hervé C. et al

2004

2018

Resistencia a los antimicrobianos por cambios genéticos.
Profozic Z. et al



Barbara Sixt et al.

OBJETIVOS

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.

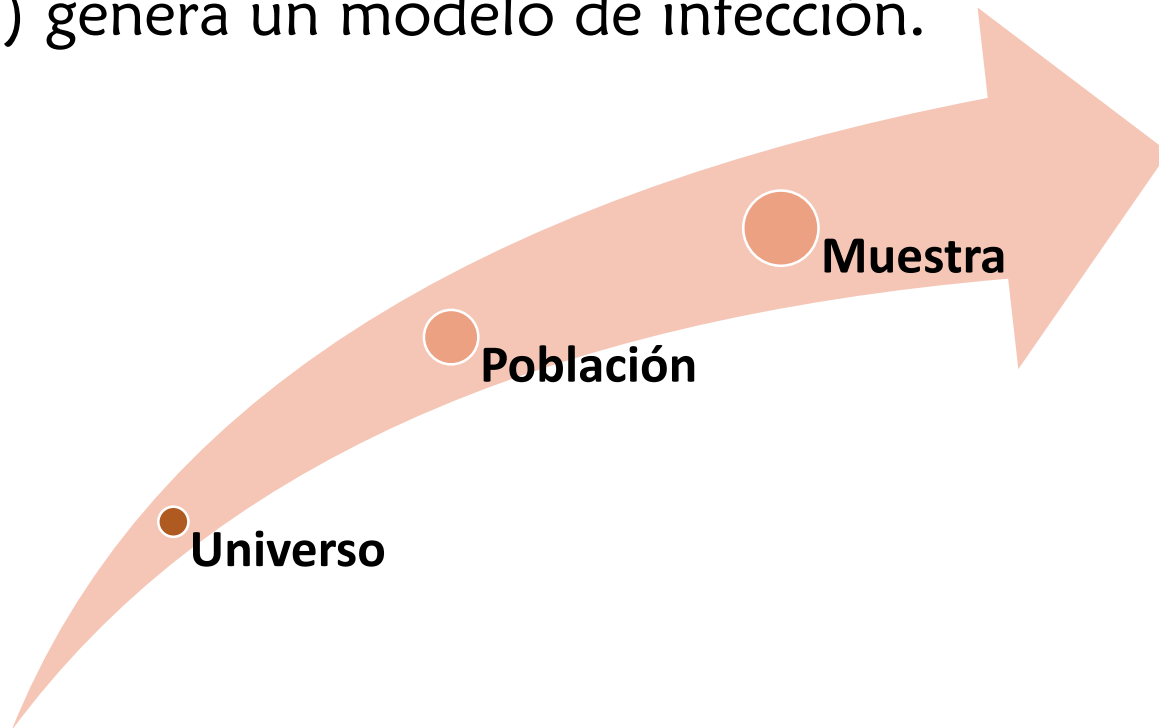
ESPECIFICOS

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

DISEÑO METODOLOGICO

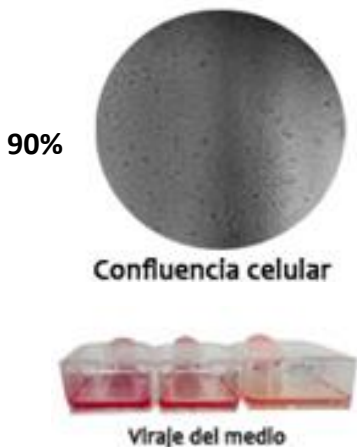
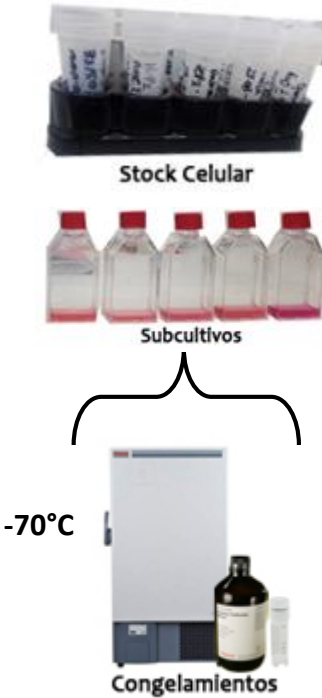
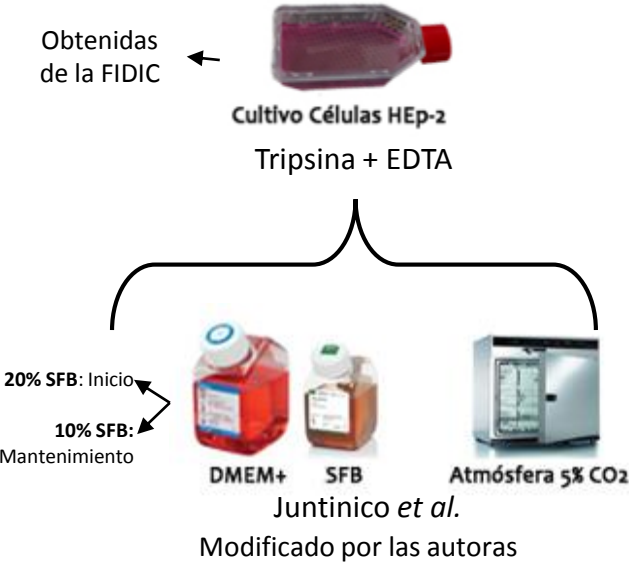
HIPOTESIS

- 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.



Establecimiento del cultivo de la línea celular HEp-2

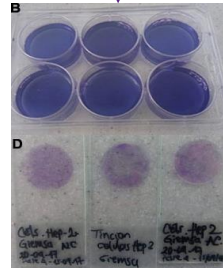
Instaurar un cultivo celular de HEp-2 para realizar la infección.



Tinción de Giemsa



En placa de 6 pozos
Esterilización
250,000 células por pozo.
Confluencia 80% en 48 horas.



Triplicado.
Fijación Metanol – 15 min.
Colorante – 15,30,40,60 min.

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR HEP-2

Con el fin de realizar la infección

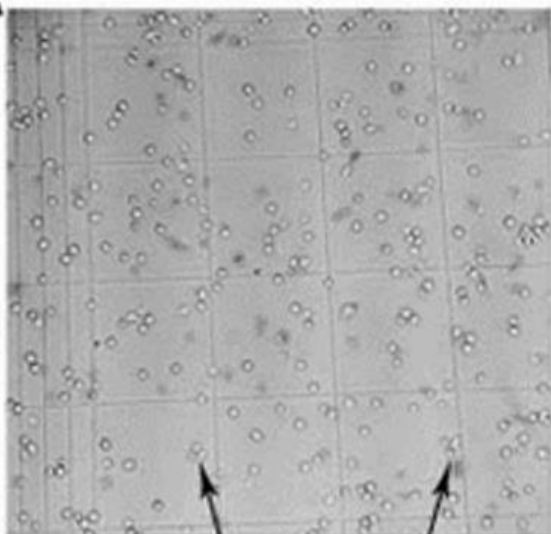


Cultivos celulares óptimos



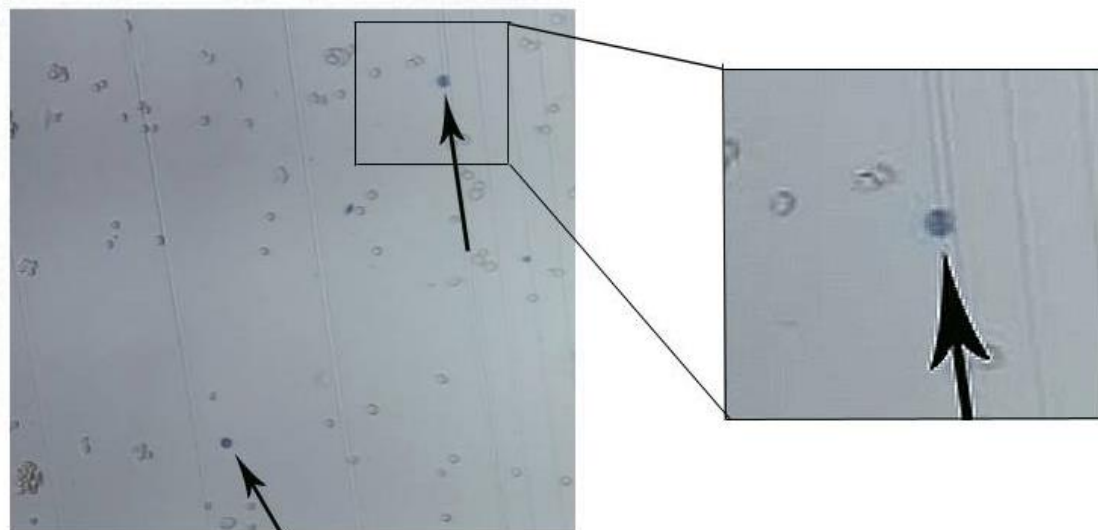
Evaluar el proceso de congelación

A



Células vivas

B



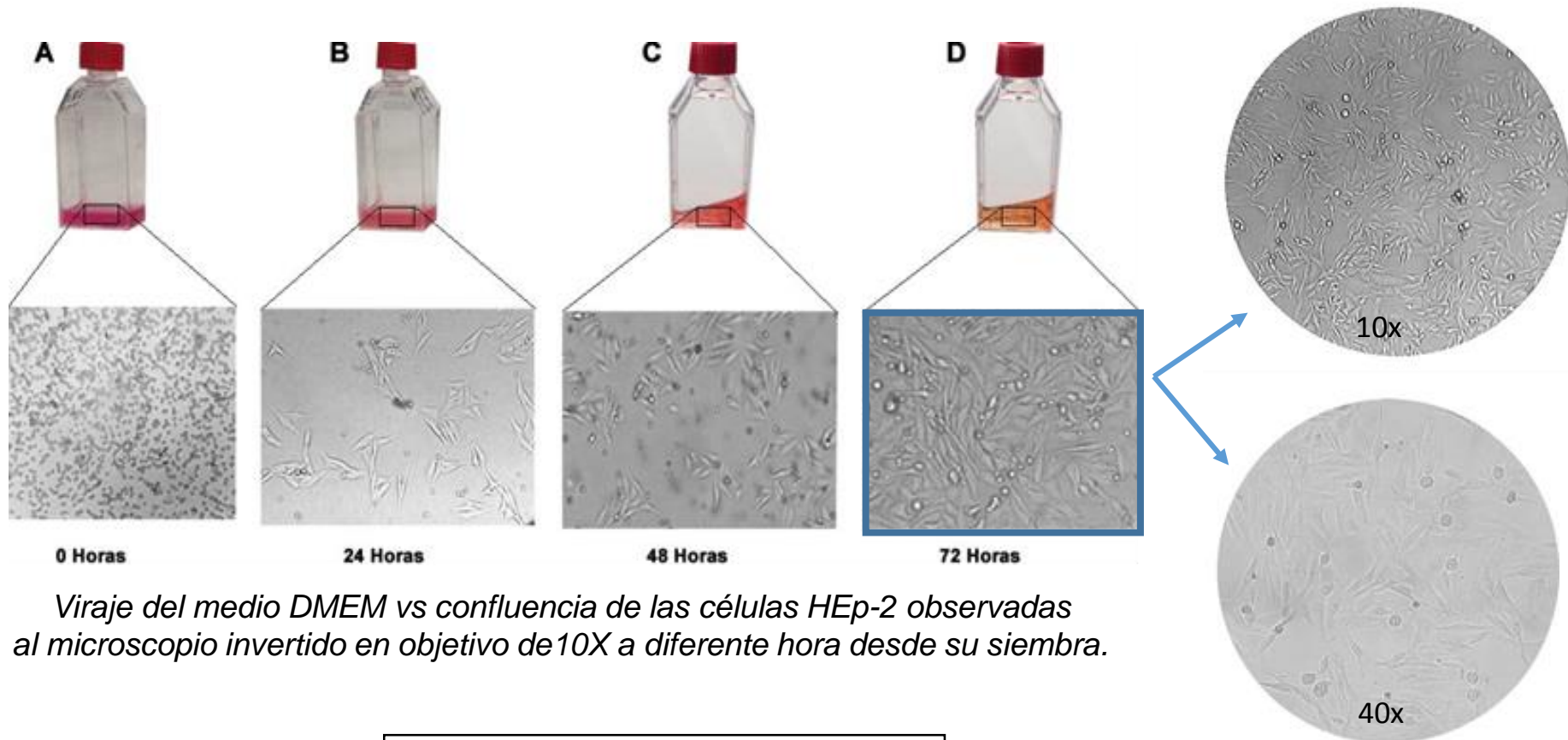
Células muertas

Procedimiento empleado fue efectivo

Procedimiento	Células vivas	Células muertas
Congelamiento	95-98%	2-5%
Descongelamiento	92-97%	3-8%

Mantener la viabilidad celular a -70°C

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR HEP-2



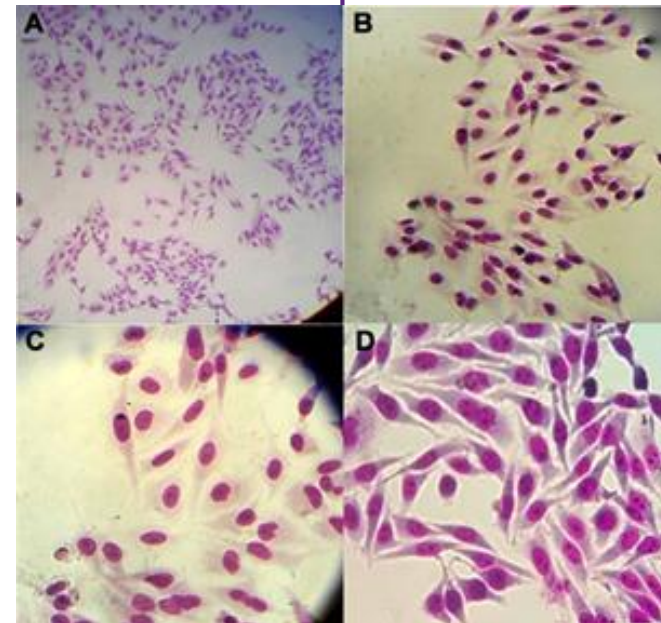
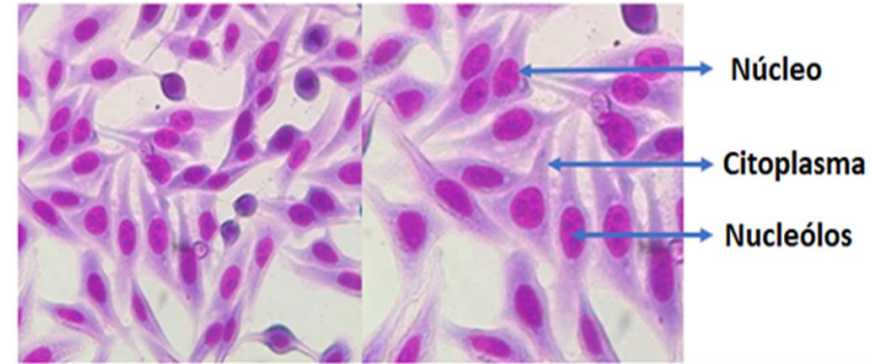
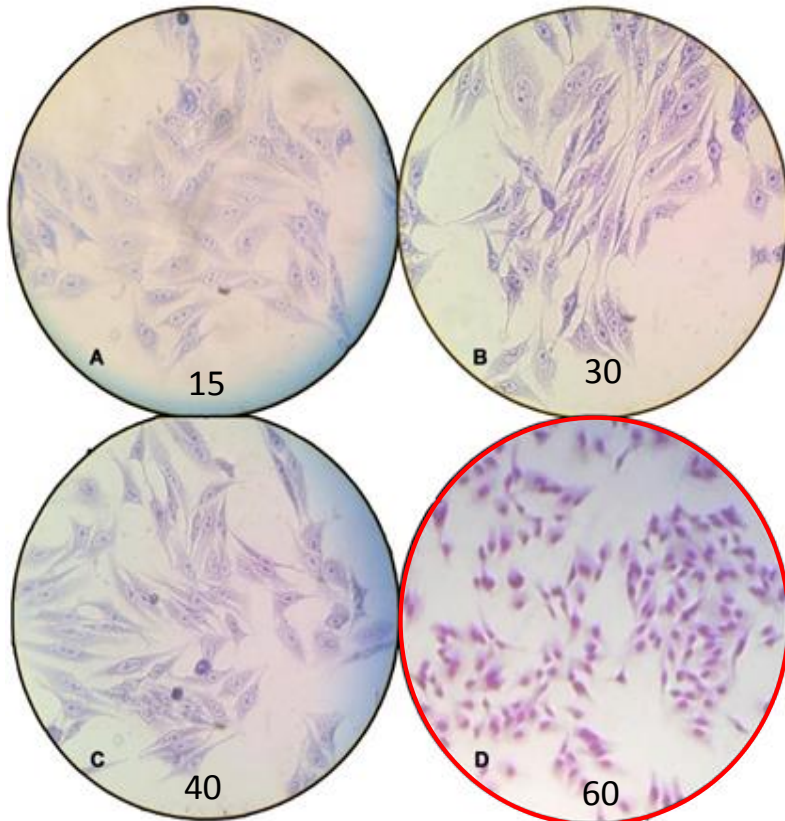
Viraje del medio DMEM vs confluencia de las células HEP-2 observadas al microscopio invertido en objetivo de 10X a diferente hora desde su siembra.

Pajaniradje *et al* y Juntinico *et al*

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR HEP-2

Tinción de GIEMSA

Coloración de Giemsa a células HEP-2 en diferentes tiempos de tinción.



Noboru Nakasone *et al*

Infección de células HEp-2 con *Chlamydia trachomatis*

Efectuar la infección de células HEp-2 con el serovar L2 de *Chlamydia trachomatis*.

***Chlamydia trachomatis* (ATCC® VR-902B™)**
Classification: *Chlamydiaceae, Chlamydia* / Product Format: frozen 1 mL per vial

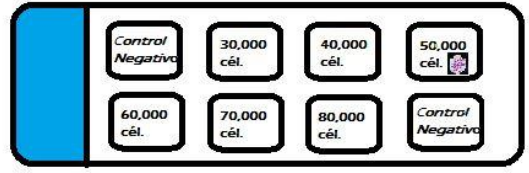
Obtenido por el grupo de Biotecnología y Genética UCMC

• Alícuotas, concentraciones.
50 uL X 20
ATCC (EB's/ LGV - L2 VR 902B)

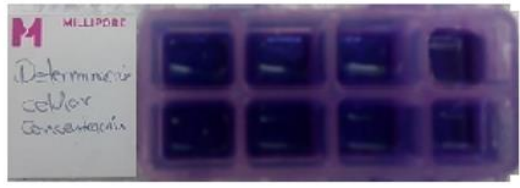


http://www.merckmillipore.com/waroot/medium/M9613_091209_046-16/86026-AL1.jpg

Determinación de concentración celular



Coloración Giemsa



Modificaciones

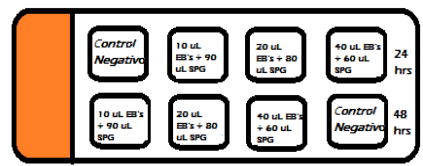
Protocolo de infección

Preparación de soluciones



+ Gentamicina
Alícuota EB's

Determinación de concentración de EB's



Células: HEp-2 SFB: 20% Medio: DMEM VF: 100 uL
Concentración celular: 50.000 células

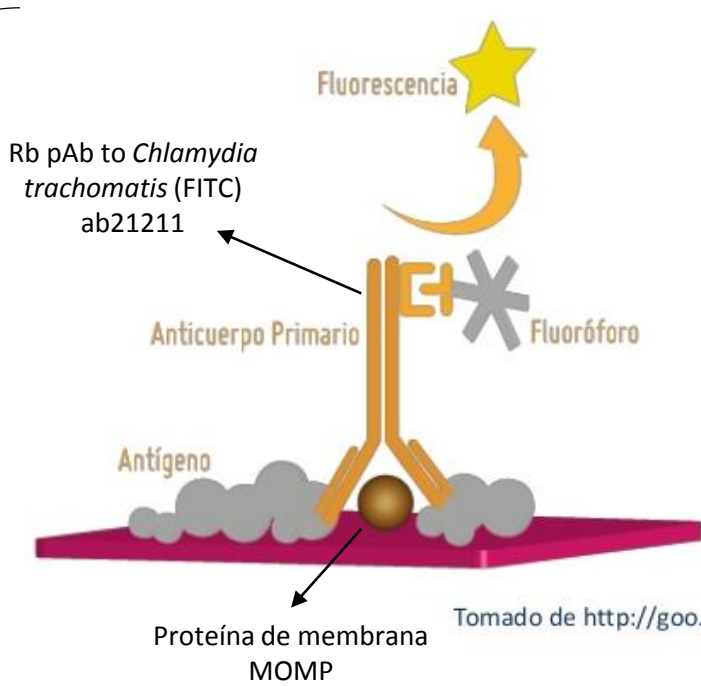


Infección de células HEp-2 con *Chlamydia trachomatis*

PROTOCOLO DE INFECCIÓN

Determinación de concentración de EB's

Inmunofluorescencia directa



Tomado de <http://goo.gl/jgO6TO>

Proceso

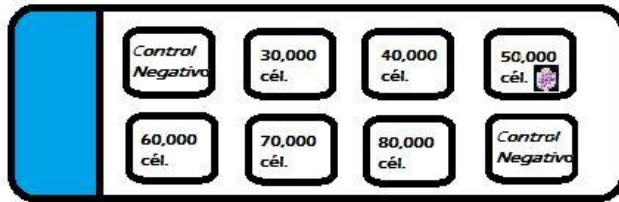
1. Fijación: Metanol 100%
2. Lavados: PBS
3. Eliminación Autofluorescencia: Cloruro de amonio
4. Saponina 0,1% - PBS+SFB 1%

Visualización

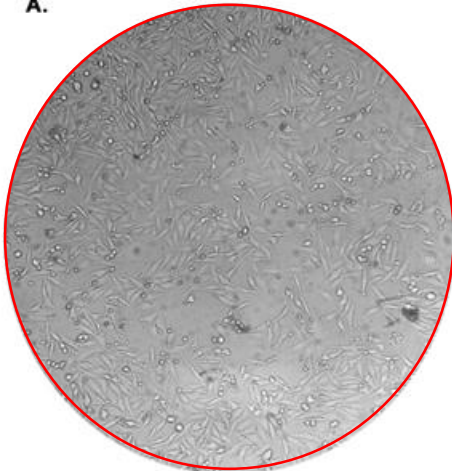
Filtros **I3 RE: 565+/-25** (ab21211) y **A RE: 360 +/- 20** (Hoechst)

INFECCIÓN DE CÉLULAS HEP-2 CON *Chlamydia trachomatis*

DMEM con SFB al 20%
con *Gentamicina*

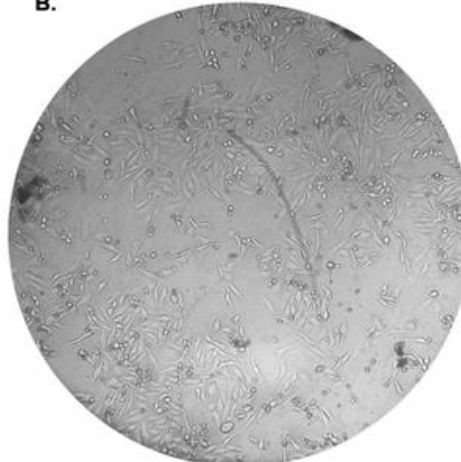


A.

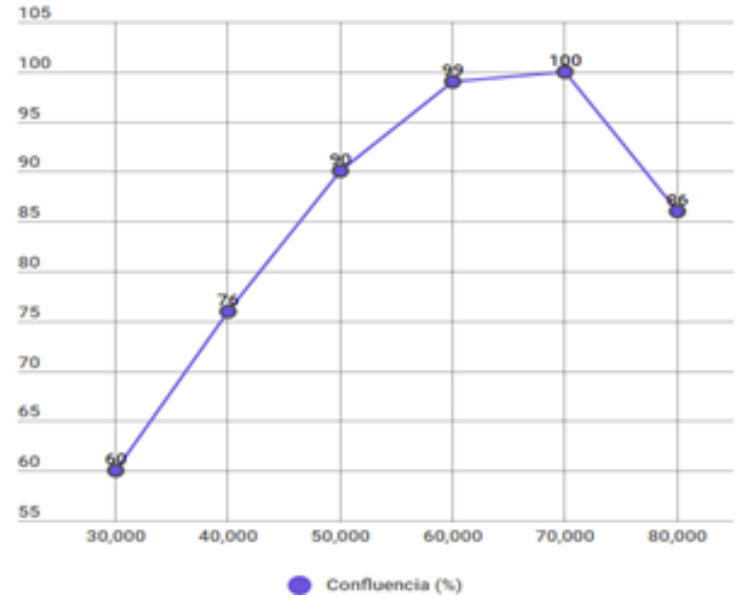


50.000 células

B.



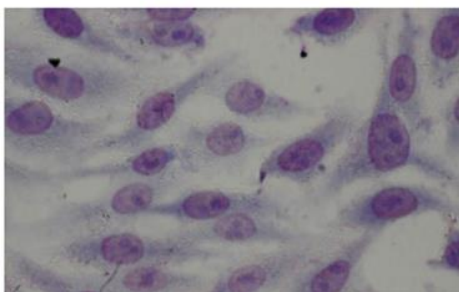
60.000 células



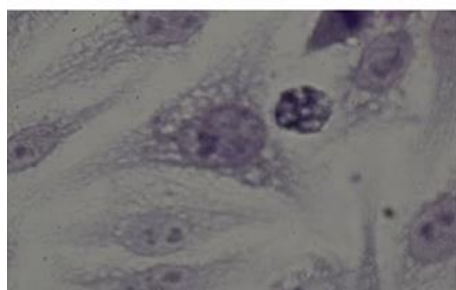
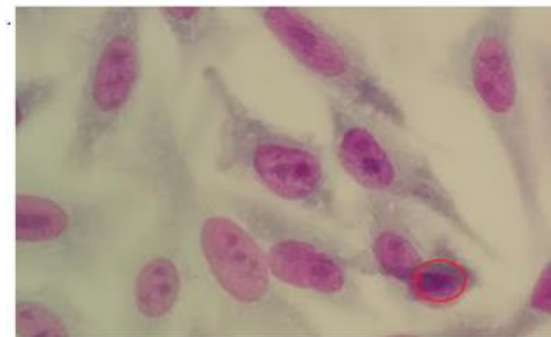
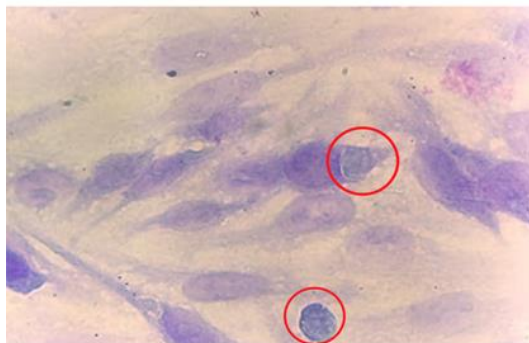
Crecimiento celular. Porcentaje de confluencia (Eje Y) VS Concentración celular (Eje X).

Nans A. et al y Derrick T et al

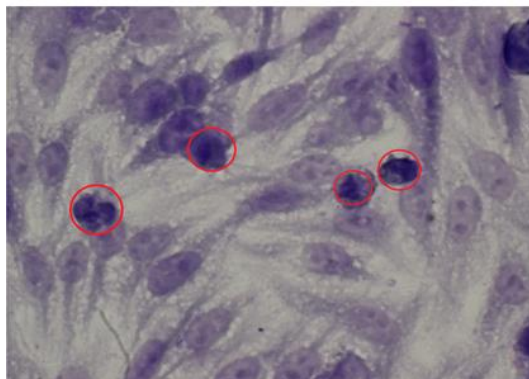
TINCIÓN DE GIEMSA (Protocolo de infección)



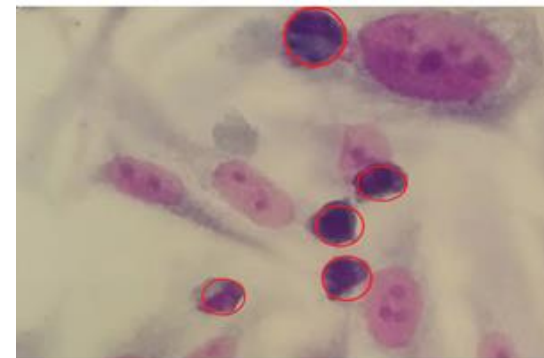
Control negativo: Células HEp-2 sin infectar



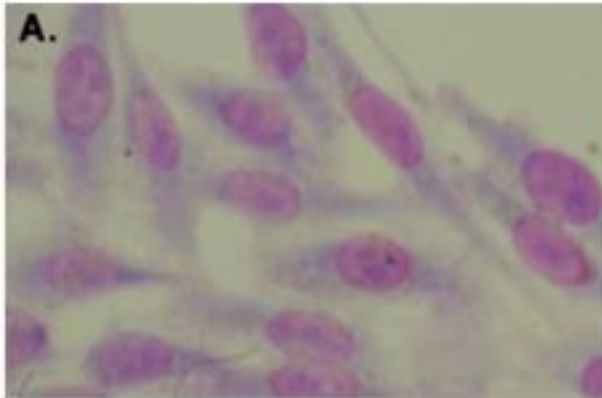
Daño celular



Células HEp-2 con cuerpos clamidiales en su citoplasma y próximos a este.

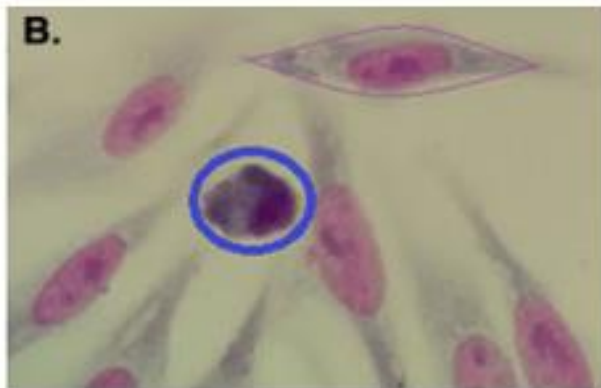


DETERMINACIÓN CONCENTRACION DE EB'S



A. Control negativo

CONCENTRACIÓN	24 HORAS	48 HORAS
	(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

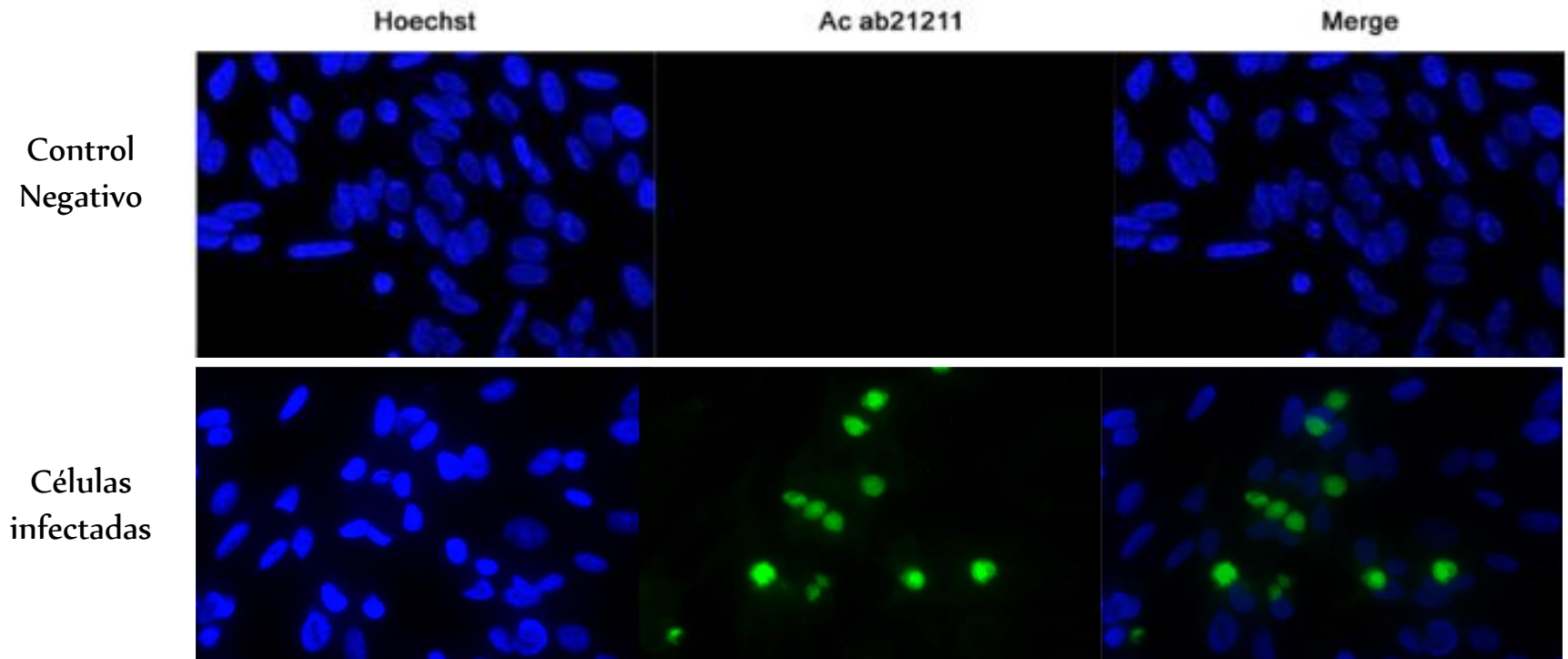


B. Infección celular

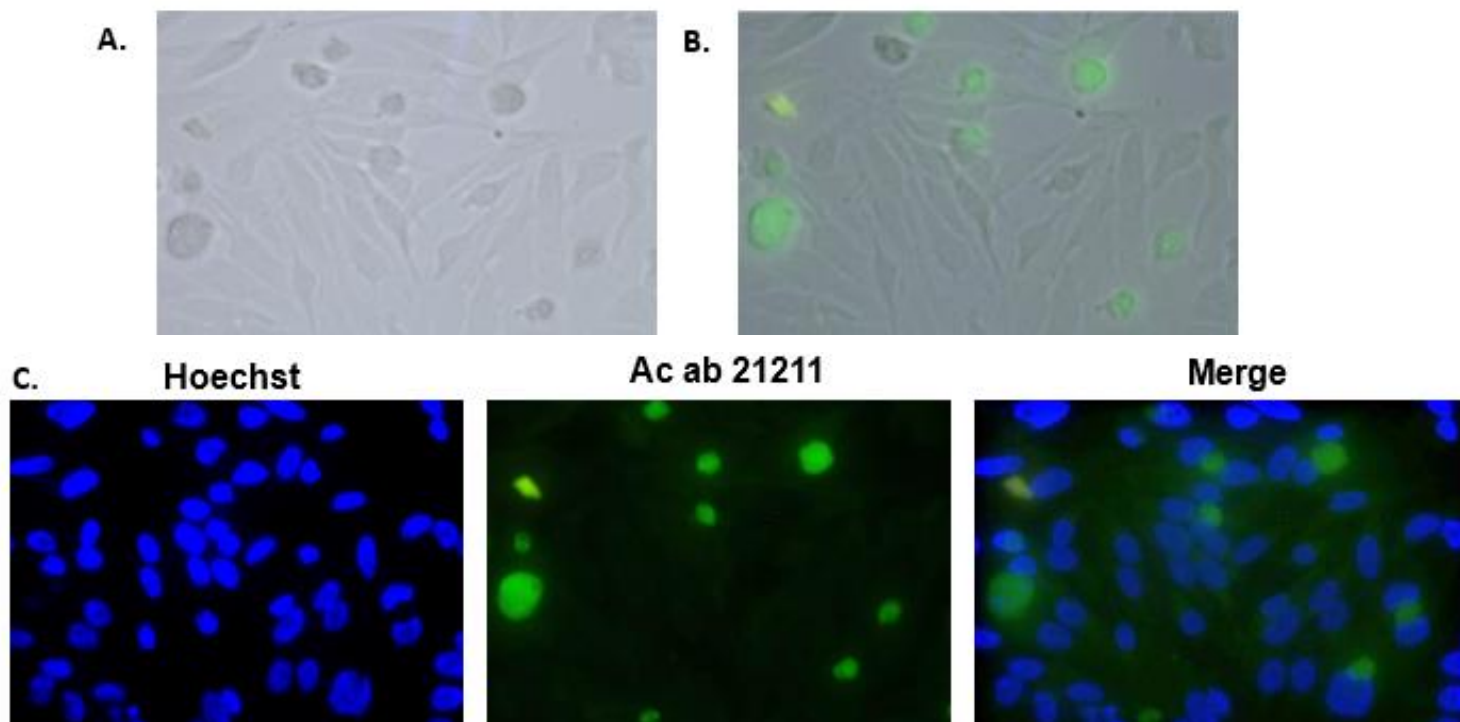
CONCENTRACIÓN	24 HORAS	48 HORAS
	(Rango aprox. de EB's en 50,000 células)	
10 uL	12,000-16,000	20,000-24,000
20 uL	24,000-28,000	32,000-36,000
40 uL	36,000-40,000	44,000-48,000

Osaka I., Scott P y Giakoumelou S. et al

INMUNOFLUORESCENCIA (Protocolo de infección)



INMUNOFLUORESCENCIA (Protocolo de infección)



Armitage CW *et al*, Nogueira AT *et al*.

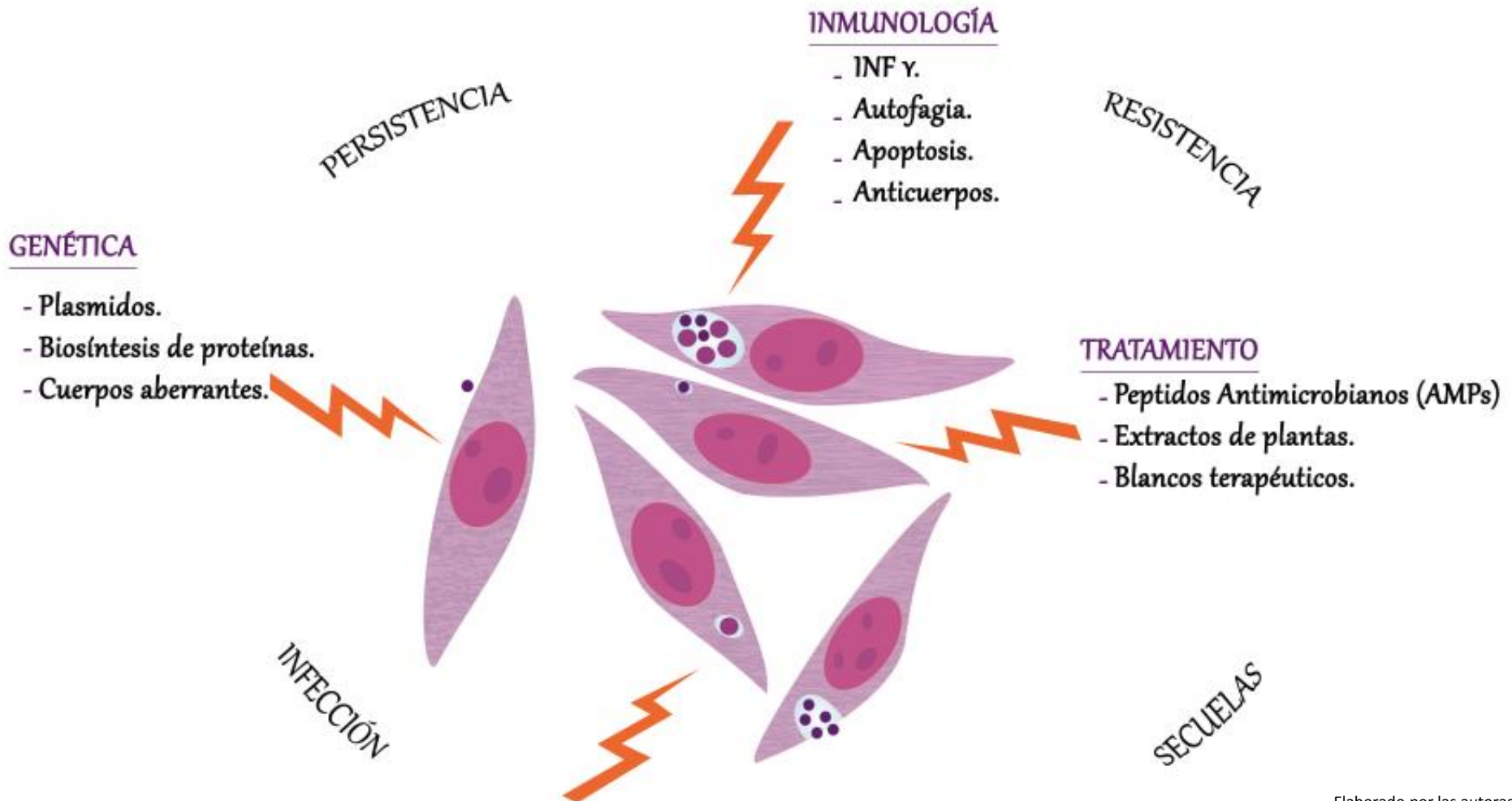
INMUNOFLUORESCENCIA (Protocolo de infección)



Células infectadas

APLICACIONES DEL MODELO

Describir las posibles aplicaciones del modelo de investigación de células HEp-2 en *Chlamydia trachomatis* serovar L2.



CONCLUSIONES

1. Para instaurar un cultivo celular de la línea HEp-2 y realizar la infección con *Chlamydia trachomatis* serovar L2, es necesario mantener las células en una atmosfera 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 determino que la concentración celular adecuada es de 50,000 células por pozo con 90% de confluencia y un volumen de 40 uL 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, inmunología, tratamiento, entre otros varios estudios.

CONCLUSIONES

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.



"ASOCIACION CIENTIFICA LATINA"
Conocimiento para la integración y progreso

Toluca, México a 7 de Septiembre de 2018

Carta de aceptación de trabajo de investigación

Castañeda Yessica Marcela, Caro Paola Andrea, Castellanos Natalia, Sánchez Mora Ruth
Melida, Gómez Martha.
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
PRESENTE

Por medio de este conducto, confirmamos de aceptado el trabajo "Infección de células HEP-2 con *Chlamydia trachomatis* serovar I2 (EB'S/LGV VR-902B) y su aplicación en investigación" para exposición en modalidad oral (código O-01), el día 15 de Noviembre de las 16:00 a las 16:20 horas, en el Auditorio del Corporativo Internacional Tenancingo, ubicado en el Km 1.3 Carretera Tenancingo – Zampahuacán, en las instalaciones de la Escuela Calmecac, Tenancingo, Estado de México, dentro del marco del VII Congreso de la Asociación Científica Latina A.C. (ASCILA) a llevarse a cabo los días 15 y 16 de noviembre.

Atte.

Hugo Mendieta Zerón, PhD.
Director General – "ASCILA"

Chlamydia trachomatis: una infección silenciosa

Chlamydia trachomatis: a silent infection

Castañeda Franco Yessica Marcela¹; Castellanos Hernández Natalia¹

Recibido: 10 de noviembre de 2017

Aceptado: 12 de diciembre de 2017

Resumen

Las infecciones de transmisión sexual producidas por *Chlamydia trachomatis* representan un problema de salud pública debido a su alta prevalencia y a las consecuencias devastadoras que ocasionan en la reproducción femenina principalmente, dado a que generan enfermedad pélvica inflamatoria, infertilidad por obstrucción tubaria y embarazos ectópicos.

Cabe resaltar que las infecciones por *Chlamydia trachomatis* son asintomáticas en 70% de las mujeres y tienen secuelas reproductivas porque no se detectan ni tratan oportunamente. Por ello, la persistencia de la infección por *C. trachomatis* durante meses o años en el área endocervical, las infecciones repetidas o un tratamiento antimicrobiano tardío son factores que favorecen que esta bacteria invada los órganos genitales superiores, como los ovarios o las trompas de Falopio. *Chlamydia trachomatis* es un patógeno que estimula respuestas inmunes tanto humorales como celulares, así mismo, puede favorecer su propia supervivencia en el huésped infectado al ocasionar ciertos cambios o alteraciones en el sistema inmune e inducir infecciones persistentes.

Palabras claves: *Chlamydia*; persistencia; infección; asintomática; prevalencia.

CERTIFICADO CURSO DE CULTIVO CELULAR

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS, EXTENSIÓN
SEDE BOGOTÁ



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS, EXTENSIÓN
SEDE BOGOTÁ



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS, EXTENSIÓN
SEDE BOGOTÁ

CERTIFICAN QUE

PAOLA ANDREA CARO BURGOS

IDENTIFICADO (A) CON C.C. 1033787590

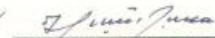
PARTICIPÓ EN EL CURSO

**CELL CULTURE AS TOOL
RESEARCH: THE DO'S AND
THE DONT'S**

REALIZADO EL 21 DE SEPTIEMBRE DE 2017, EN LA CIUDAD DE
BOGOTÁ, CON UNA INTENSIDAD DE 8 HORAS.

DADO EN BOGOTÁ, EL 21 DE SEPTIEMBRE DE 2017.


LUCY GABRIELA DELGADO M.
Directora Departamento Farmacia


HELBER DE JESUS BARBOSA B.
Secretario Facultad de Ciencias

CERTIFICAN QUE

**YESSICA MARCELA CASTAÑEDA
FRANCO**

IDENTIFICADO (A) CON C.C. 1026301586


PARTICIPÓ EN EL CURSO

**CELL CULTURE AS TOOL
RESEARCH: THE DO'S AND
THE DONT'S**

REALIZADO EL 21 DE SEPTIEMBRE DE 2017, EN LA CIUDAD DE
BOGOTÁ, CON UNA INTENSIDAD DE 8 HORAS.

DADO EN BOGOTÁ, EL 21 DE SEPTIEMBRE DE 2017.


LUCY GABRIELA DELGADO M.
Directora Departamento Farmacia


HELBER DE JESUS BARBOSA B.
Secretario Facultad de Ciencias

CERTIFICAN QUE

**NATALIA CASTELLANOS
HERNÁNDEZ.**

IDENTIFICADO (A) CON C.C. 1023962576


PARTICIPÓ EN EL CURSO

**CELL CULTURE AS TOOL
RESEARCH: THE DO'S AND
THE DONT'S**

REALIZADO EL 21 DE SEPTIEMBRE DE 2017, EN LA CIUDAD DE
BOGOTÁ, CON UNA INTENSIDAD DE 8 HORAS.

DADO EN BOGOTÁ, EL 21 DE SEPTIEMBRE DE 2017.


LUCY GABRIELA DELGADO M.
Directora Departamento Farmacia


HELBER DE JESUS BARBOSA B.
Secretario Facultad de Ciencias

AGRADECIMIENTOS

- A la doctora Ruth Melida Sánchez Mora por todo el apoyo brindado durante estos dos años.
- A la profesora Martha Gómez y al grupo de Biotecnología y Genética.
- A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia.
- A nuestros familiares por su acompañamiento en estos cinco años.