



Mantenimiento de la línea celular HEp-2 infectada con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2.

Angie Lorena Cortés Pineda¹, Maura Gómez Torres², Laura Julieth Gonzalez Pacheco³, Ruth Melida Sánchez Mora⁴, Natalia Castellanos Hernández⁵

Estudiantes de Pregrado de Bacteriología y Laboratorio Clínico^{1,2,3}, asesora interna⁴, asesora externa⁵

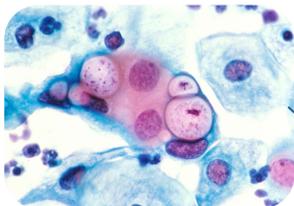
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Semillero de Biotecnología y Genética
Junio, 2022



BIOTECNOLOGÍA Y
GENÉTICA



Chlamydia trachomatis.



ITS
-Vaginales, anales,
orales
-Transmisión vertical

15 serotipos
A-C: Trachoma
D-K: I. Oculo-genitales
L1,L2,L3: LGV

Resistencia

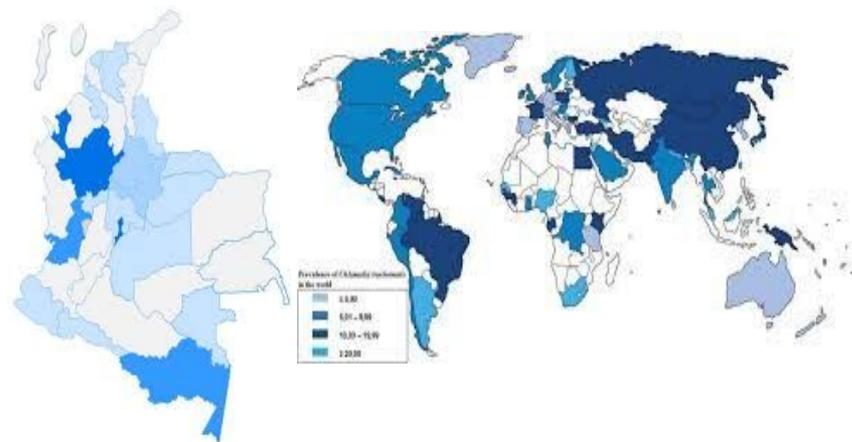


-Infertilidad
-linfogranuloma
venéreo



-Embarazo ectópico
-Infertilidad
-Enfermedad
inflamatoria pélvica
-Cervicitis
-Dolor pélvico

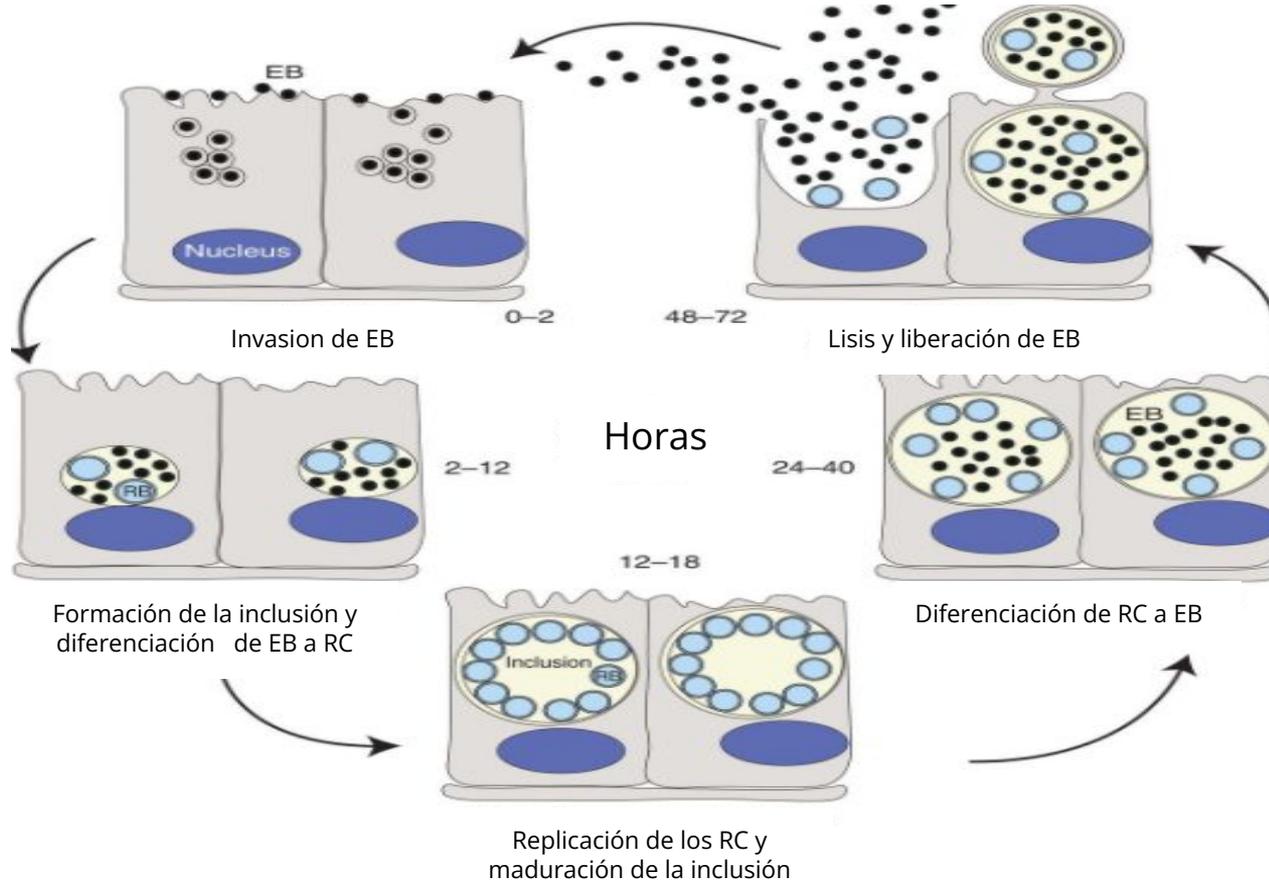
Alta prevalencia en el país y a nivel mundial



4.1% de prevalencia en Colombia

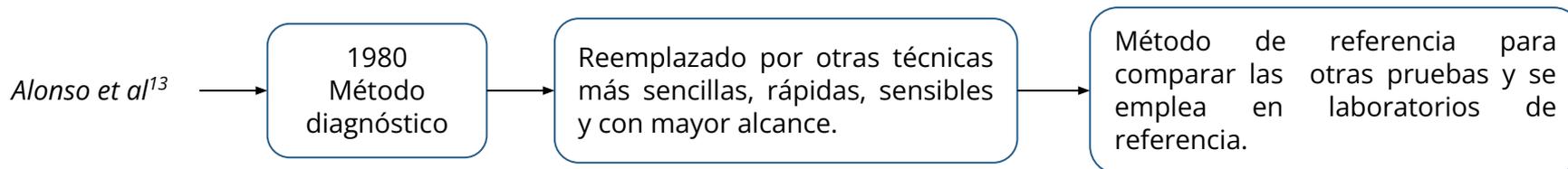
Tomado de:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572020000300534

Ciclo de vida de *Chlamydia*





Importancia del cultivo celular.



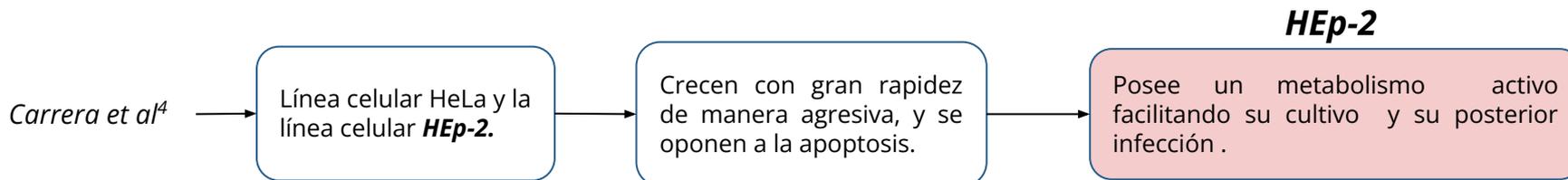
Ventajas

- Validar nuevos métodos diagnósticos.
- Evaluar la viabilidad del microorganismo.
- Obtener cepas para su posterior caracterización y producción de antígenos.
- Resistencia de péptidos antimicrobianos en ensayos clínicos de eficacia de tratamientos.



Desventajas

- Técnicas exigentes.
- Incubación tardía, crecimiento lento y escaso.
- El personal debe estar altamente calificado.
- Microorganismo muy lábil.





Howard et al.

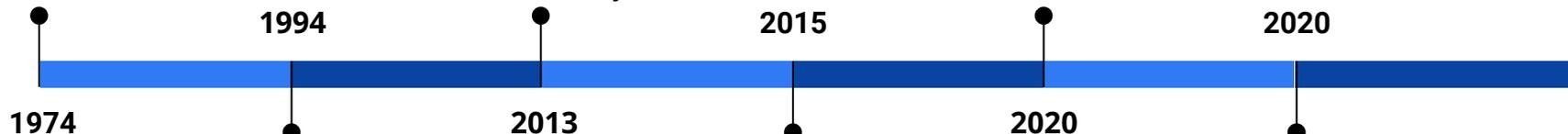
Purificación en gradientes de densidad de renografin de *Chlamydia trachomatis* cultivada en sacos vitelinos de huevos.

Jutinico et al.

Cultivo de la línea celular HEp-2: doblaje poblacional y coloración con Giemsa
Perspectivas para el estudio de la infección con *Chlamydia trachomatis*.

Faris et al.

Propagación y purificación de transformantes y mutantes de *Chlamydia trachomatis*
Serovar L2



Beatty et al.

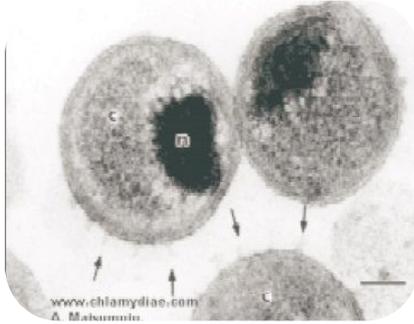
Clamidias persistentes: del cultivo celular a un paradigma para la patogénesis de las clamidias

Carrera et al.

Comparación del cultivo celular de HeLa y HEp-2: Perspectivas de estudios con *Chlamydia trachomatis*.

Castellanos et al

Células HEp-2 infectadas con EB's de *Chlamydia trachomatis* serovar L2.



Cuerpo elemental



**Cuerpos
elementales
bastante
lábilis**

Dificultan la investigación
básica

La estandarización de una técnica de obtención de dichos cuerpos elementales a partir de un modelo in vivo de infección de células HEp-2 por C. trachomatis serovar L2 reduciría notablemente costos en investigación básica.



Objetivos.

Objetivo General

Estandarizar el cultivo y mantenimiento de la línea celular HEP-2 infectada con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2.

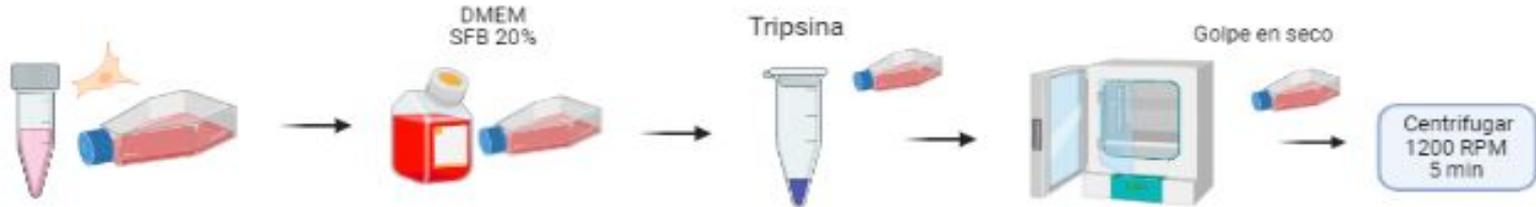
Objetivos específicos

- Establecer el cultivo y mantenimiento de la línea celular Hep-2 sin infectar.
- Efectuar la infección de células HEP-2 con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2.
- Propagar la línea celular infectada con los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2, para futuras investigaciones



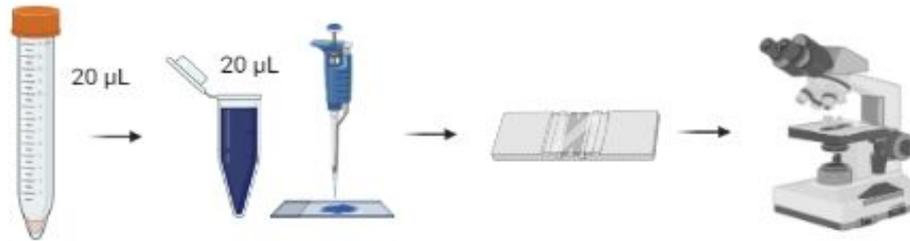
Preparación, mantenimiento y coloración de la línea celular HEp-2.

Mantenimiento

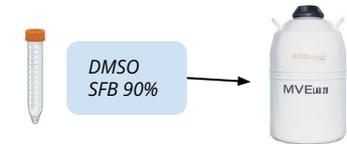


Viabilidad Azul de tripano

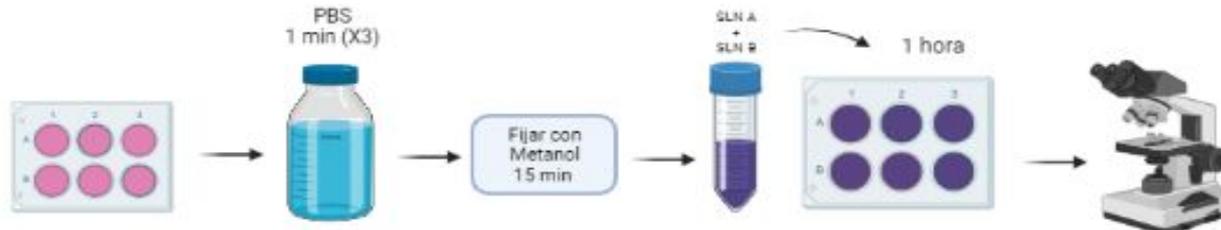
Viabilidad = Factor de dilución x profundidad de la cámara x promedio del conteo de los cuadrantes x volumen de suspensión



CONGELACION



Coloración de Giemsa

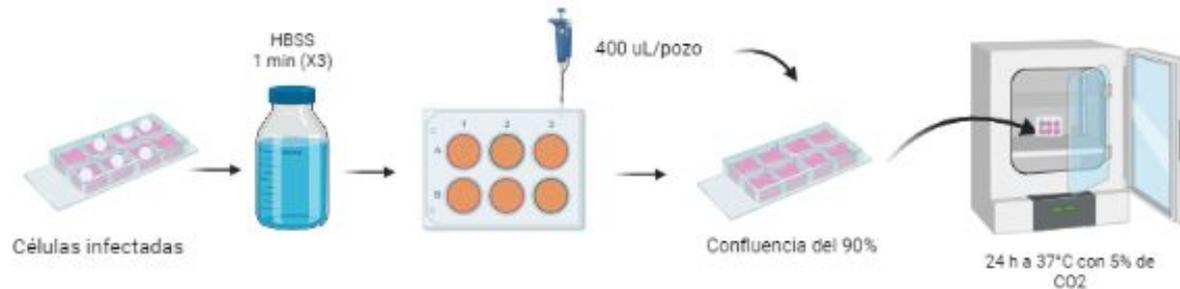


Infección y propagación de las células HEp-2 con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2.

Infección

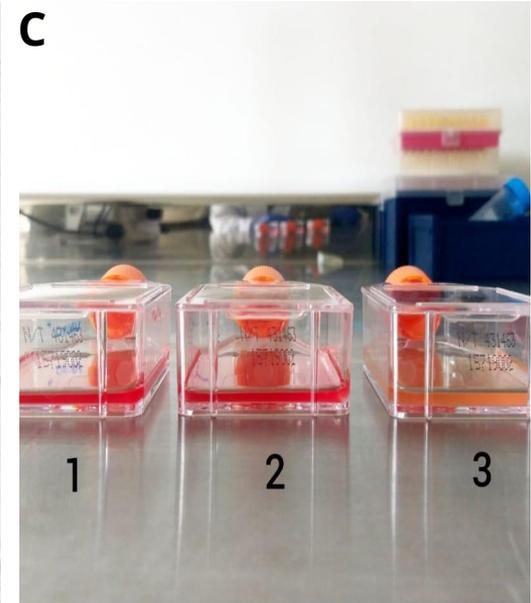
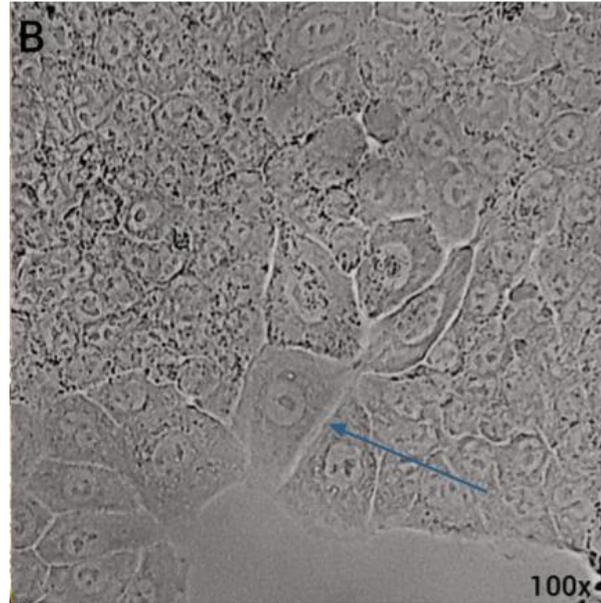
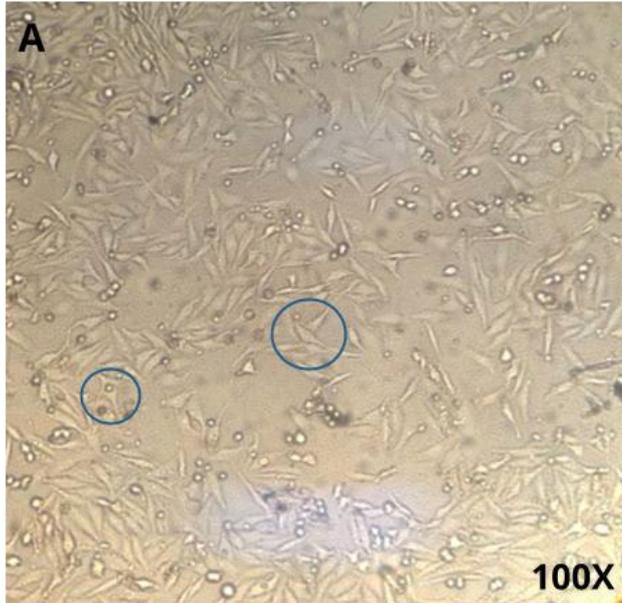


Propagación





Morfología y mantenimiento de la línea celular HEp-2.

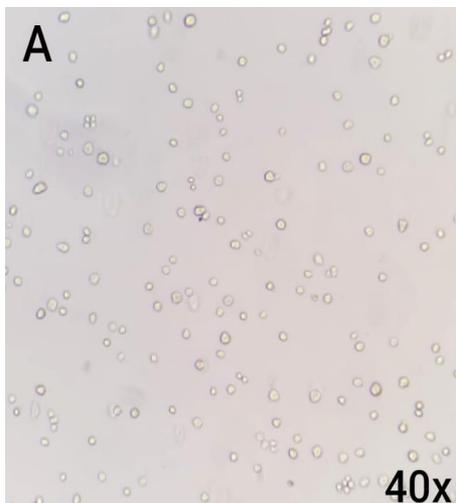


Morfología celular: Células alargadas, citoplasma bien delimitado, núcleo y nucleolos

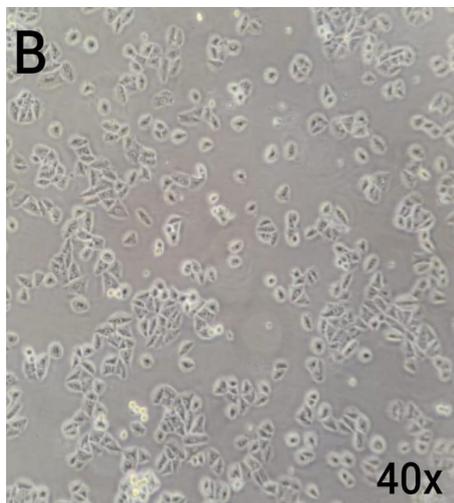
Metabolismo celular



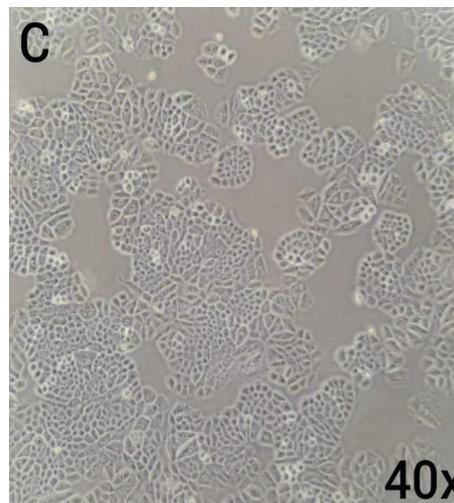
Confluencia de la línea celular HEp-2.



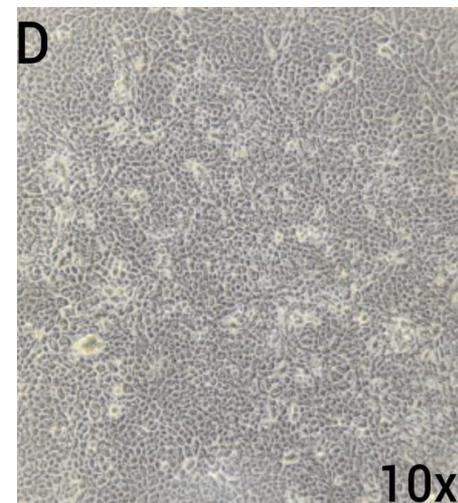
Células en suspensión



**24 horas
Confluencia del 40%**



**48 horas
Confluencia del 70%**



**72 horas
Confluencia del 100%**

Juntinico et al⁵

Medio MEM - SFB 10%: Confluencia del 45%
Medio DMEM - SFB 10%: Confluencia del 80%

Carrera⁴

Medio DMEM GIBCO - SFB 10%: Confluencia del 80%
Medio DMEM - SFB 20%: Confluencia del 90%

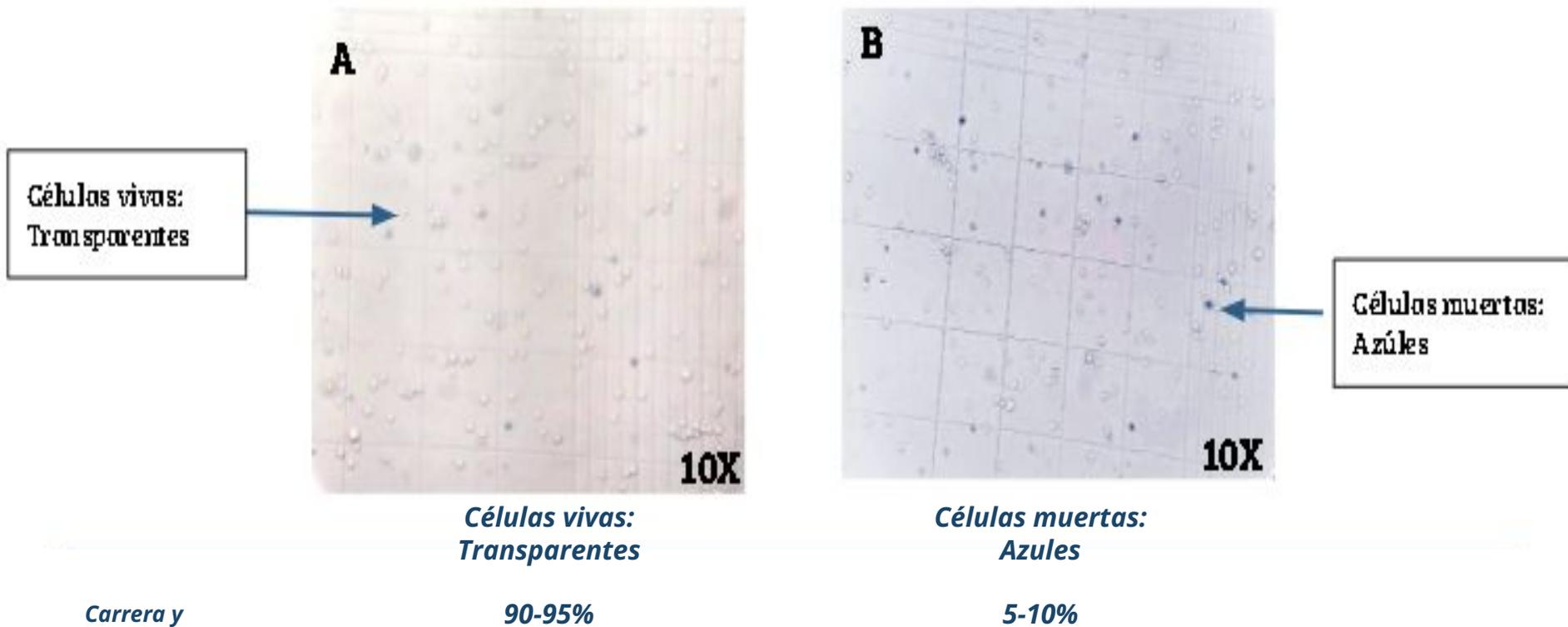
Castellanos et al⁶

**Medio DMEM - SFB 10%:
Confluencia del 70%**

**Medio DMEM aporta
mayor cantidad de
aminoácidos, vitaminas y
hormonas.**



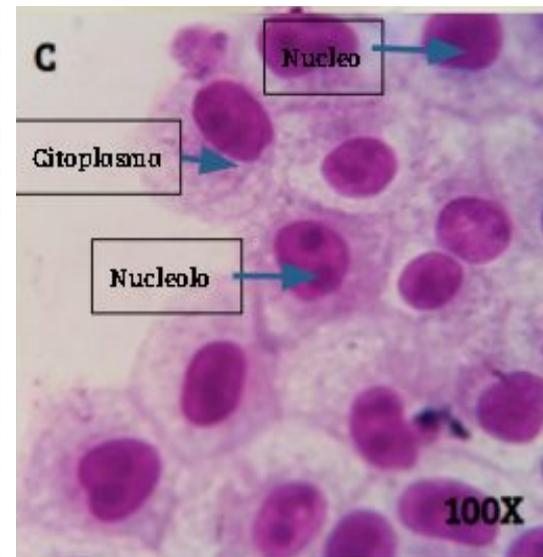
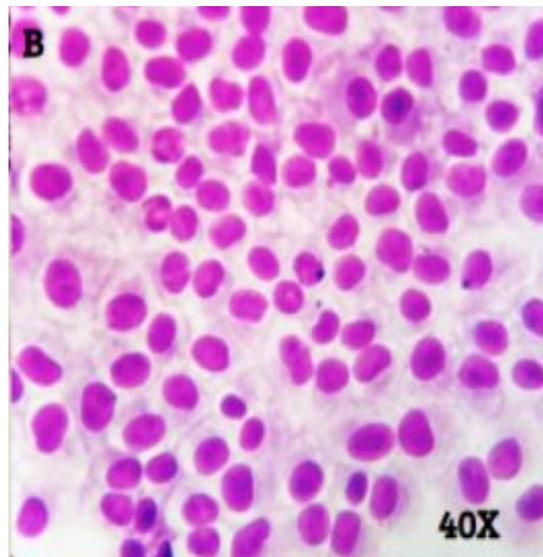
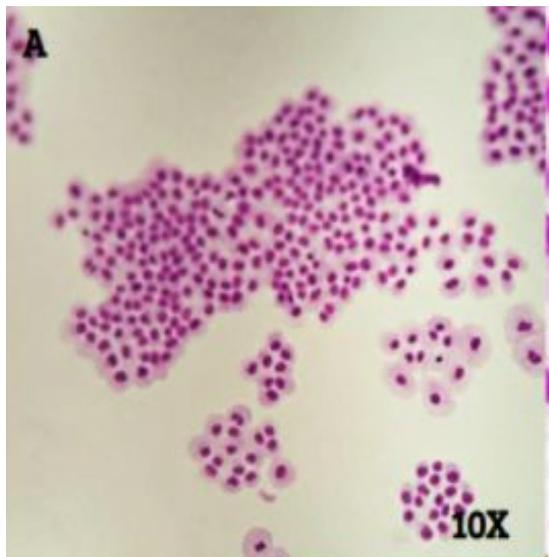
Viabilidad de las células HEp-2.



Carrera y
colaboradores⁴



Morfología de las células HEp-2 teñidas con Giemsa.



Citoplasma: Morado

Núcleo: Fucsia

Nucleolos: 1-2

Carrera et al⁴ -----

Sln A+B; fijación metanol y 1 hora de colorante

Juntinico et al⁵ -----

30 partes sln amortiguadora + 1 parte sln madre;
fijación metanol y 1 hora de colorante

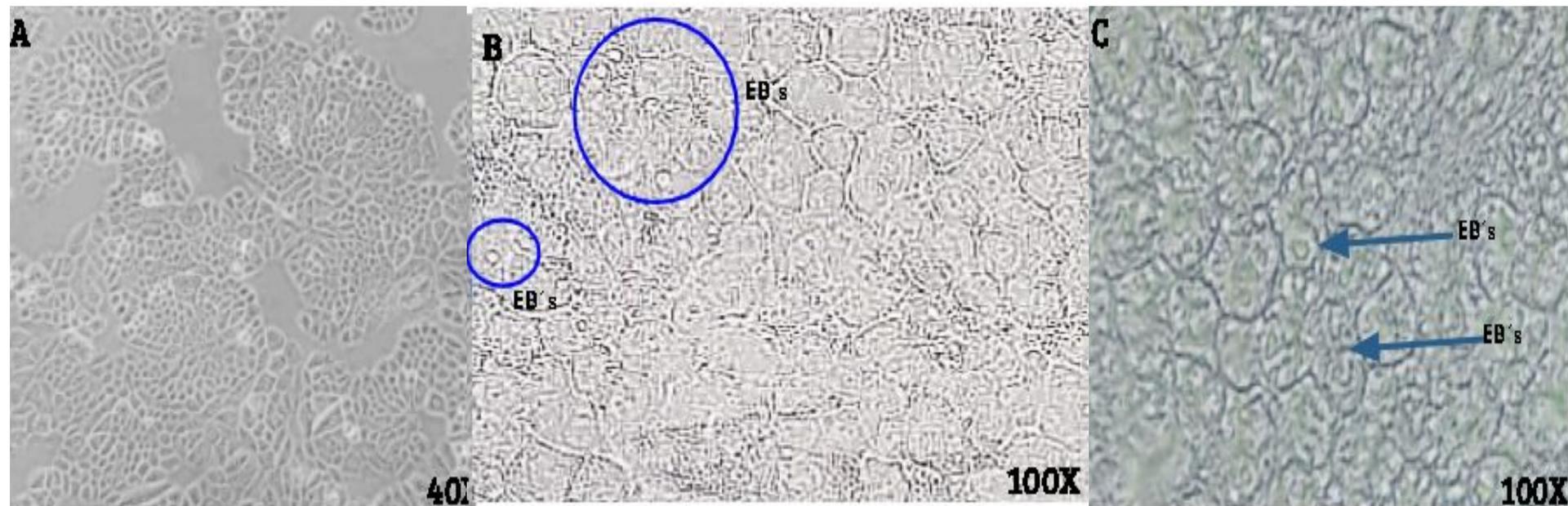
Castellanos et al⁶ ----

Solución A y B; fijación metanol y 1 hora de colorante

Tiempo de exposición 1 hora con el colorante y la fijación con metanol



Células HEp-2 infectadas con *Chlamydia trachomatis* a las 0, 24 y 48 hpi.



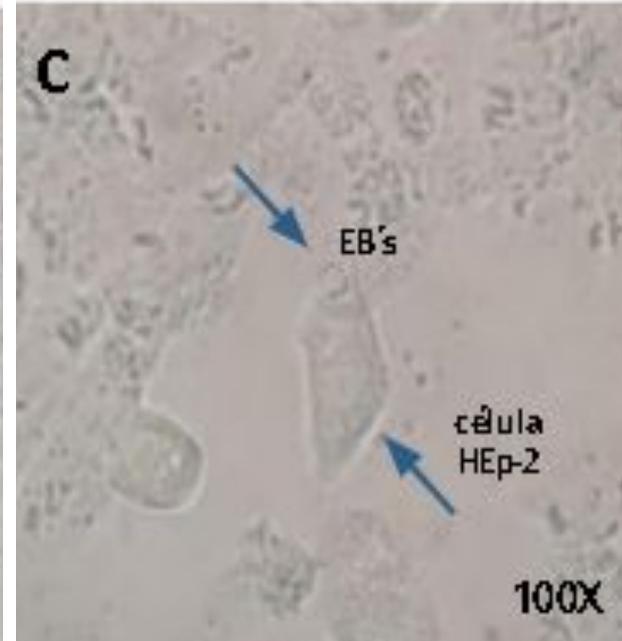
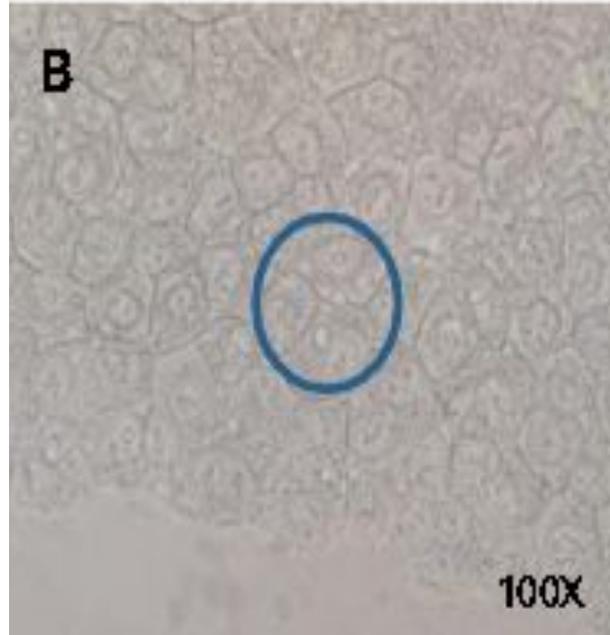
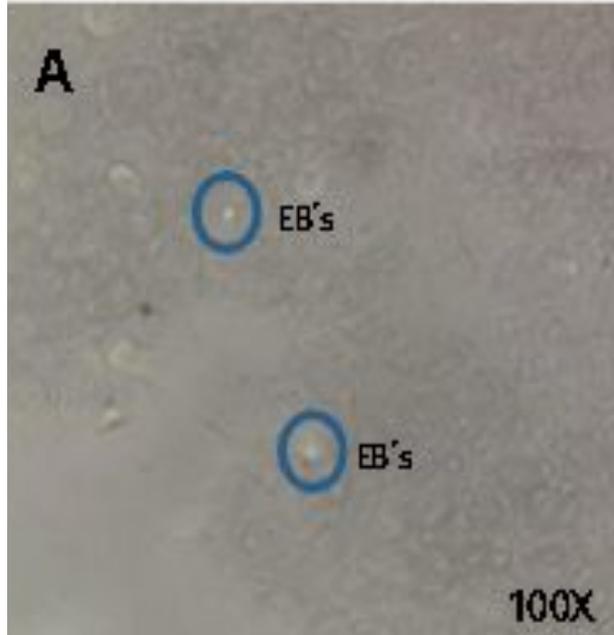
0 horas
Confluencia del 90%

24 horas

48 horas

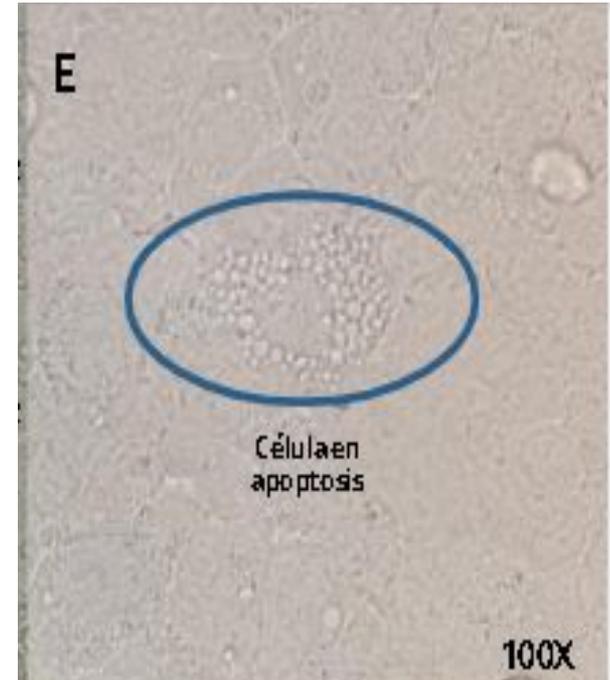
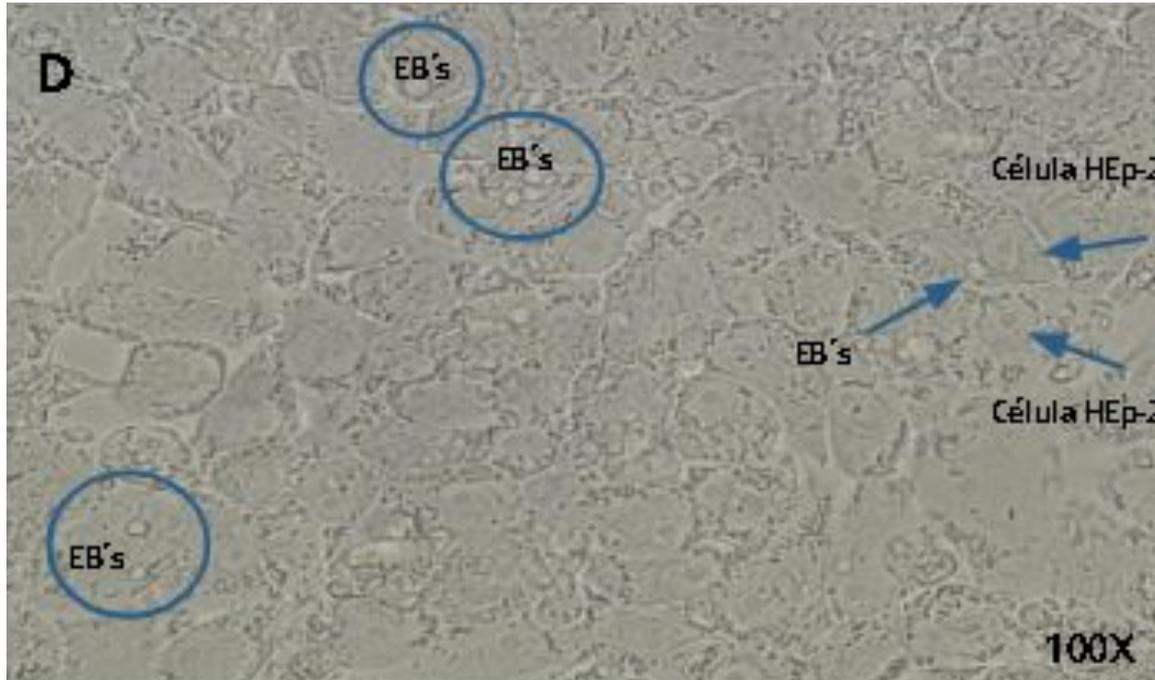


Línea celular HEp-2 a las 72 horas post infección.



Cuerpos Elementales: Circulares, pequeños, bien delimitados y refringentes

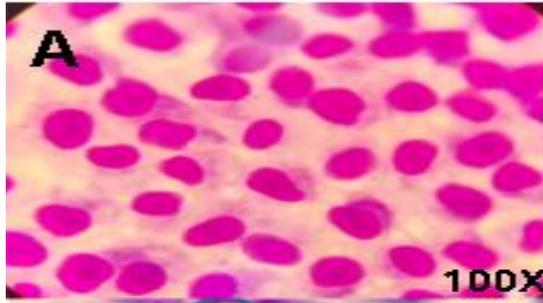
Línea celular HEp-2 a las 72 horas post infección.



EBs : Circulares, pequeños, bien delimitados y refringentes
Células HEp-2: Citoplasma y núcleo



Células HEp-2 infectadas con *Chlamydia trachomatis*.



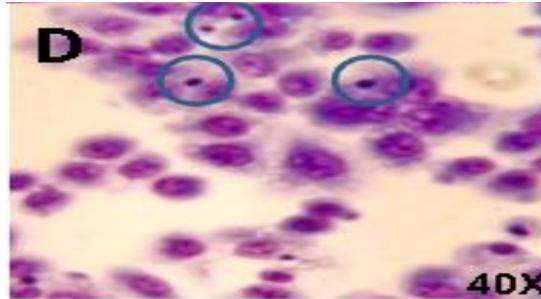
Control Negativo: 0 horas



24 horas



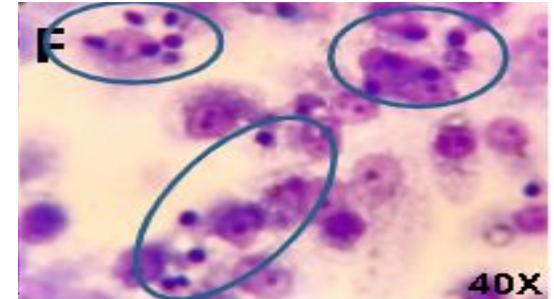
48 horas



48 horas



72 horas



72 horas

CAMBIO EN LA MORFOLOGÍA CELULAR TRAS LA INFECCIÓN

Castellanos y colaboradores⁶

Muerte apoptótica y daño en la morfología celular



Conteo de EB's de *Chlamydia trachomatis* obtenidos a las 24, 48 y 72 hpi.

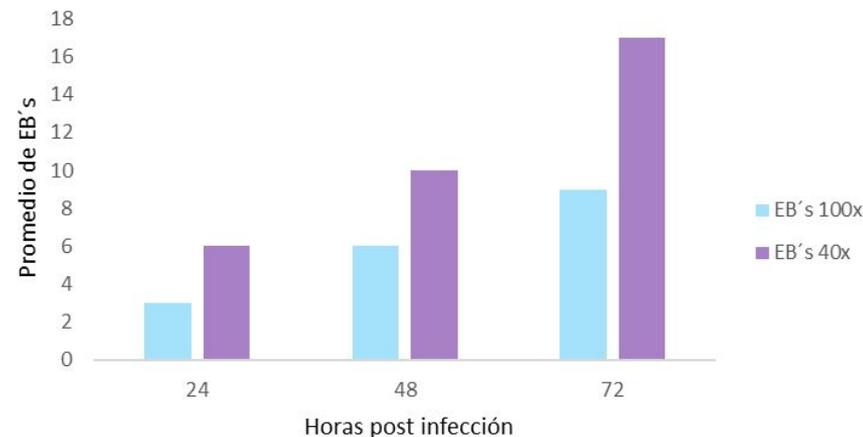
Objetivo de 100x	24 horas post infección	48 horas post infección	72 horas post infección
EB's extracelulares	0	2	4
EB's intracelulares	3	4	5
Total de EB's	3	6	9
MOI	0.11	0.23	0.36

Conteo de los EB's *C. trachomatis* serovar L2 post infección, visualizados en objetivo de 100x.

Objetivo de 40x	24 horas post infección	48 horas post infección	72 horas post infección
EB's extracelulares	1	4	9
EB's intracelulares	5	6	8
Total de EB's	6	10	17

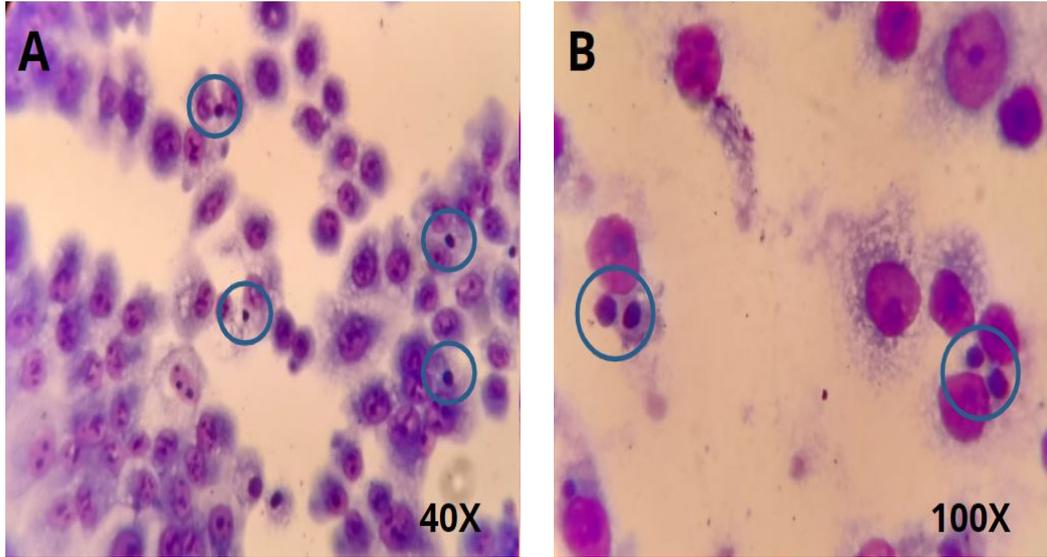
Conteo de los EB's *C. trachomatis* serovar L2 post infección, visualizados en objetivo de 40x.

Gráfica del recuento de EB's de *Chlamydia trachomatis* serovar L2 después de 24, 48 y 72 hpi



Esta gráfica refleja que el aumento de los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* es directamente proporcional al tiempo transcurrido tras la infección.

Propagación de EBs de *C. trachomatis* a partir de la línea celular HEp-2 previamente infectada.



48 horas post infección



Fue posible la propagación de los EBs de *C. trachomatis* a partir de la línea celular HEp-2 previamente infectada.

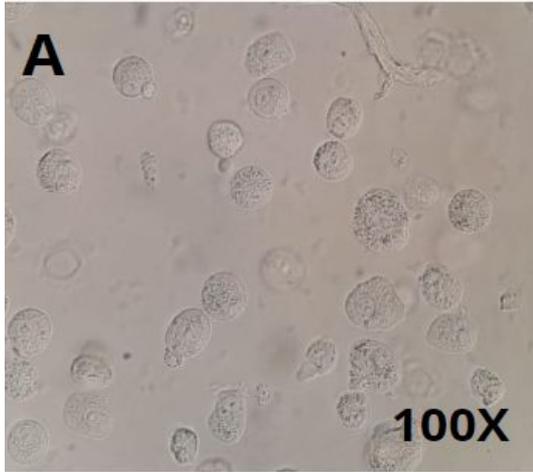
Conteo de los EB's *C. trachomatis* serovar L2 tras propagación

48 horas post infección	40X	100X
EB's extracelulares	5	3
EB's intracelulares	3	2
Total de EB's	8	5
MOI	0.05	0.2

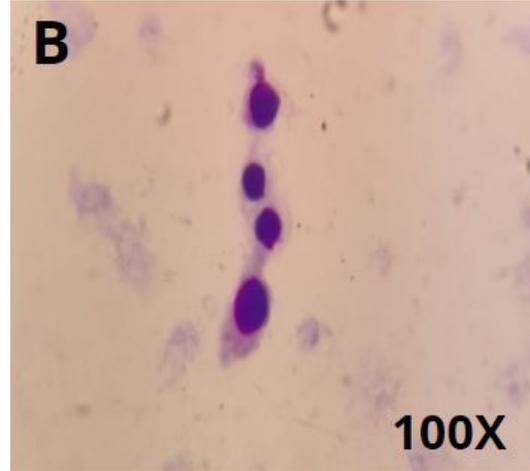
Patrick y colaboradores²²

Medio RPMI 1640
Células HeLa
MOI 0.5

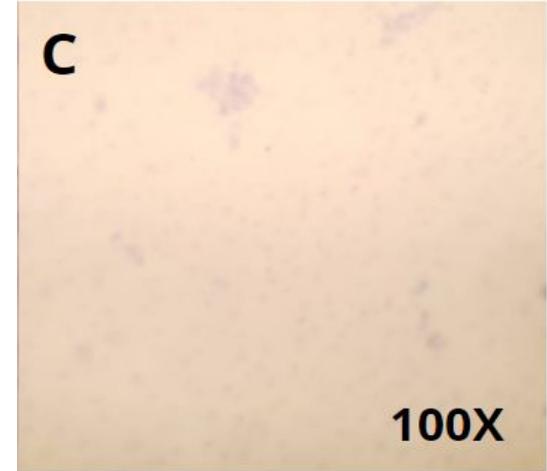
Mantenimiento de la línea celular HEp-2 infectada.



Células en suspensión



Giemsa



Giemsa

**Congelación de
línea celular
HEp-2 infectada**

El DMSO y SFB
90% ya no es
suficiente

- Aunque la bacteria puede entrar en
estado de persistencia
- Las células pierden *estabilidad,*
viabilidad

Al descongelar las células e
incubarlas con medio DMEM
suplementado, ya no hay
adherencia celular

Aunque no fue posible mantener la línea celular infectada, la viabilidad y capacidad infecciosa de los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* queda pendiente por demostrar en futuras investigaciones.

Conclusiones.

- Se logró el cultivo y mantenimiento de la línea celular HEp-2 para el crecimiento de los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2.
- Se efectuó la infección de células HEp-2 con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2, y se demostró por medio de la coloración de Giemsa la morfología habitual de las células HEp-2 y los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis*
- La evidencia presentada, nos lleva a concluir que no fue posible realizar el mantenimiento de la línea celular HEp-2 infectada con cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2 pues después de la infección las células presentan un cambio en su morfología y daño celular que les impide continuar con su metabolismo habitual.
- Se logró la propagación de la línea celular HEp-2 infectada con los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* serovar L2, para futuras investigaciones.



Proyecto de investigación en curso.

Nodo Bogotá Cundinamarca, encuentro XIX, 2021.

Nodo nacional, encuentro XXIV, 2021. Meritorio.



EL SUSCRITO COORDINADOR DE LA RED COLOMBIANA DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN NODO BOGOTÁ - CUNDINAMARCA CERTIFICA QUE

La Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, registrada con el NIT: 800144829-9, participó en el XXIV ENCUENTRO NACIONAL Y XXIII ENCUENTRO INTERNACIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN, FUNDACIÓN REDCOLSI, el cual se llevó a cabo los días 2 al 5 de noviembre de 2021 virtualmente, con los estudiantes y/o docentes relacionados a continuación:

No.	Nombre completo	Documento de Identidad
1	BERNARDITA ANA HERNANDEZ	1.002.283.190
2	DANIELA ESTEBAN DE JESUS PARRA	1.000.264.479
3	JOSEY NATALIA SALAZAR CARRERA	1.002.246.938
4	MARCELA CAMILA BUSTOZ PEREZ	1.000.089.489
5	DANIELA LORENA BERNARDINI CLAUDIO	1.000.970.985
6	MARCELA ESTHERANNE ROSALES ABEVILLO	1.000.248.311
7	MARCELA MICHELLE COLLAJUAN OLIVERO	1.000.262.730
8	DANIEL FELIPE GALIANO SANCHEZ	1.000.003.008
9	PAOLA ANDREA GONZALEZ BARRERO	1.004.779.206
10	DANIELA ALICIA GONZALEZ PACHECO	1.000.268.920
11	EMERSON JULIETTE GUZMAN TORRES	1.004.260.479
12	YANETHA RENZO BUSTOZ	1.000.268.490
13	DANIELA LORENA HUALGO PULIDO	1.000.003.380
14	ANDREA ANDREA ALFARO RODRIGUEZ	1.000.267.576
15	DANIELA ROSA MARTINEZ LEON	1.002.317.260
16	PAOLA ANDREA MARTINEZ RODRIGUEZ	1.000.000.480
17	ANDREA YANETHA HERNANDEZ LOPEZ	1.000.267.648
18	MITZI DANIELA MARCEL CONTRERAS	1.000.264.960
19	LIDIA MARIA MENDEZ VARGAS	1.004.256.008

Agradecimientos

- A la Doctora Ruth Melida Sanchez por permitirnos formar parte del semillero Biotecnología y Genética; desarrollar nuestro trabajo de investigación en el, y brindarnos los medios para obtener este logro. A Natalia Castellanos por su entrega, dedicación y paciencia en este proyecto, por darnos la oportunidad de ser aprendices y encaminarnos en el campo de la investigación.
- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por formarnos todo este tiempo como estudiantes y abrirnos sus puertas desde el momento de la admisión hasta el día de hoy.
- A cada una de nuestras familias por el apoyo y el cariño que nos aportan diariamente.



1. Howard L, Orenstein N, King N. Purification on Renografin Density Gradients of Chlamydia trachomatis Grown in the Yolk Sac of Eggs. American Society for Microbiology Journals. [Internet] 1974 [cited 19 april 2021] Available in: <https://aem.asm.org/content/27/1/102.short>
2. Faris R, Weber M. Propagation and Purification of Chlamydia trachomatis Serovar L2 Transformants and Mutants. Bio Protoc. [Internet]. 2019. [cited 17 april 2021]. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7854018/?report=reader#!po=57.5000>
3. Moorman DR, Sixbey JW, Wyrick PB. Interaction of Chlamydia trachomatis with Human Genital Epithelium in Culture. Microbiology Society. [Internet] 1986 [cited 19 april 2021]; 132 Available in: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/132/4/mic-132-4-1055.pdf>
4. Carrera LC, Pirajan ID, Urrea MC, Sánchez RM, Gómez M, Monrroy LA. Comparación del cultivo celular de HeLa y HEp-2: Perspectivas de estudios con Chlamydia trachomatis. NOVA. [Internet] 2015 [citado 08 de abril del 2021]; 13. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000100002
5. Juntinico P, Malagón J, Manrique JM, Gómez M, 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] 2013 [citado 05 abril 2021]; 11. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/1836>
6. Castellanos N, Castañeda MY, Caro AP, Sánchez RM. Células hep-2 infectadas con eb's de Chlamydia trachomatis serovar 2 (vr-902b). NOVA. [Internet]. 2020. [cited 17 april 2021]; 18. Available in: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/1092>
7. Beatty W, Morrison R, Byrne G. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. Microbiol Rev. [Internet] 1994 [cited 19 april 2021] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372987/?page=1>
8. Ostos O, Sánchez R. Chlamydia trachomatis: avances y perspectivas. NOVA [Internet] 2003 [citado 19 de abril del 2021]; 1. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/1051/1045>
9. Zhong G, Fan P, Huang Y. Identification of a Chlamydial Protease-Like Activity Factor Responsible for the Degradation of Host Transcription Factors. J Exp Med. [Internet] 2001 [cited 19 april 2021] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193410/#!po=87.5000>
10. Howie S, Horner P, Horne A, Entrican G. Immunity and vaccines against sexually transmitted Chlamydia trachomatis infection. Curr Opin Infect [Internet] 2011 [cited 18 april 2021] 24. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3211059/>